

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2003. 08. 28

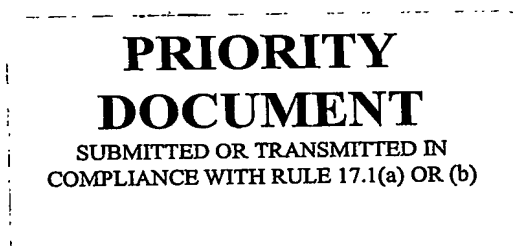
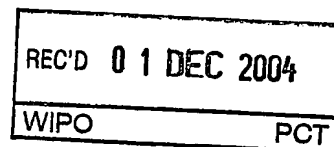
申 请 号： 03152848. 1

申 请 类 别： 发明

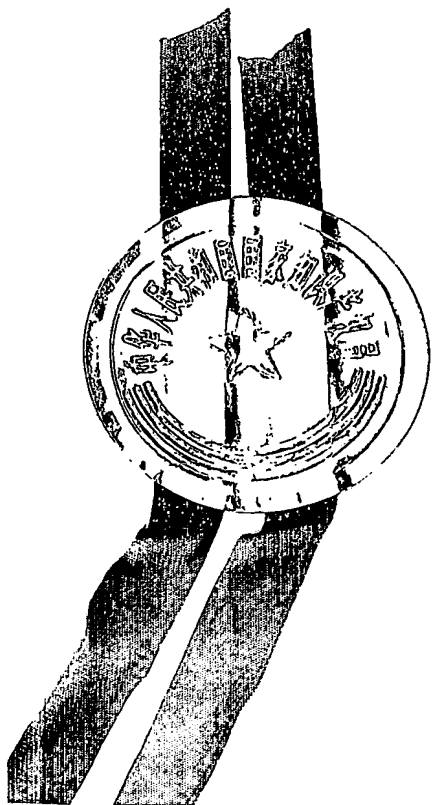
发明创造名称： 河豚肽的制备工艺及其医药保健用途

申 请 人： 南京宝生药业有限公司

发明人或设计人： 陈丁丁、高利忠



BEST AVAILABLE COPY



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2004 年 10 月 21 日

权 利 要 求 书

1. 一种用河豚鱼皮和/或包括鱼鳍在内的鱼骨制备的以河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物为主要化学成分和活性成分的蛋白质多肽制品——河豚肽。

2. 一种用河豚鱼皮和/或包括鱼鳍在内的鱼骨制备河豚肽的工艺方法，它包括以下步骤：

(1)原料预处理：

a.天然河豚鱼皮、鱼骨原料的脱毒预处理：在室温 $\sim 100^{\circ}\text{C}$ 用酸液或碱液处理 30 分钟 ~ 48 小时，充分水洗，如此重复 4 至 6 次；

b.依次用自来水和去离子水将人工淡水饲养繁育的河豚鱼皮、鱼骨原料及脱毒后的天然河豚鱼皮、鱼骨原料洗净，冷藏备用；

(2)提取：按下述三种提取方法之一进行：

a.向预处理后的河豚鱼皮、鱼骨为任意比例的原料加入水或酸液，在室温 $\sim 125^{\circ}\text{C}$ ，常压至 3 个大气压下，提取 30 分钟 ~ 100 小时，滤取液态部分，如此重复 0 ~ 6 次，合并滤液，将残渣加水或与滤液合并粉碎匀浆得匀浆液；

b.向预处理后的河豚鱼骨原料加入水或酸液，在室温 $\sim 125^{\circ}\text{C}$ ，常压至 3 个大气压下，提取 30 分钟 ~ 100 小时，滤取液态部分，如此重复 0 ~ 6 次，合并滤液，弃去残渣，将滤液浓缩至原体积的 100%至 5%后，加入适量河豚鱼皮原料，在室温 $\sim 125^{\circ}\text{C}$ ，常压至 3 个大气压下，提取 30 分钟 ~ 100 小时，滤取液态部分，再加水或同样的酸液提取，如此重复 0 ~ 6 次，合并滤液，将残渣与滤液合并后粉碎匀浆得匀浆液；

c.向预处理后的河豚鱼皮、鱼骨为任意比例的原料中加入无机碱液，在 $45^{\circ}\text{C} \sim 85^{\circ}\text{C}$ 下加热提取 30 分钟 ~ 48 小时，滤除碱液，如此重复 0 ~ 3 次，用水洗净碱液，加水匀浆，得匀浆液；

(3)浓缩：

匀浆液经过滤去渣，滤液浓缩至原体积的 100%至 5%后，得提取物浓缩液；

(4)干燥粉碎：

提取物浓缩液经喷雾干燥、冷冻干燥，或者烘干、阴干后粉碎至 80 目以上，得淡黄色或白色粉状制取物——主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽；

其中，所用的酸液为有机酸或无机酸液，碱液为无机碱液，提取时使用终浓度为 0.001 至 2.0 mol/L ，脱毒时使用终浓度为 0.1 至 2.0 mol/L ；喷雾干燥条件为进风温度 $190^{\circ}\text{C} \sim 350^{\circ}\text{C}$ ，出风温度为 $70^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}$ ；冷冻干燥条件为 -40°C 预冻，干燥压力为 $10 \sim 35 \text{ Pa}$ ，

升华干燥温度为 $-35^{\circ}\text{C}\sim-5^{\circ}\text{C}$ 。

3. 根据权利要求 2 所述的工艺方法，其特征是在浓缩步骤后按下述三种水解方法之一进行控制性部分水解处理：

(1)蛋白水解酶水解，条件：反应体系中的蛋白水解酶浓度为 1mg/L 至 250 mg/L ，搅拌，温度为 30°C 至 65°C ，时间为 30 分钟至 100 小时；

(2)有机酸和/或无机酸水解，条件：反应体系中的酸浓度为 0.001 mol/L 至 2.0 mol/L ，搅拌，温度为室温至 100°C ，时间为 30 分钟至 72 小时；

(3)无机碱水解，条件：反应体系中的碱浓度为 0.001 mol/L 至 2.0 mol/L ，搅拌，温度为室温至 100°C ，时间为 30 分钟至 72 小时；

再将水解液浓缩，干燥得主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽；

4. 根据权利要求 2 所述的工艺方法，其特征是在浓缩步骤后按下述三种沉淀方法之一进行沉淀处理：

(1)向提取物浓缩液中加入其 5~15 倍体积量的丙酮，在 10°C 以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀置室温或鼓风烘房、箱除去残余有机溶剂，干燥得主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽；

(2)向提取物浓缩液中加入乙醇至终浓度为 55~90%，在 10°C 以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀置室温或鼓风烘房、箱除去残余有机溶剂，干燥得主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽；

(3)向提取物浓缩液中加氯化钠至终浓度为 $2.4\sim4.0\text{ mol/L}$ ，在 10°C 以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，用 95%乙醇洗涤脱水去盐，干燥得主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽；

5. 根据权利要求 4 所述的工艺方法，其特征是将沉淀方法(3)所得沉淀复溶于浓度为 $0.1\sim1.0\text{mol/L}$ 浓度的醋酸或盐酸溶液，加氯化钠至 $1.0\sim1.7\text{ mol/L}$ 终浓度，在 10°C 以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，用 95%乙醇洗涤脱水去盐，干燥得主要含 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽；

6. 根据权利要求 5 所述的工艺方法，向离心上清中补加氯化钠至 $2.4\sim4.0\text{ mol/L}$ 终浓度，于 10°C 以下沉淀 24~48 小时后，离心或滤取沉淀，用 95%乙醇洗涤脱水去盐，干燥得主要含 I 型和/或 II 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽

7. 根据权利要求 3 所述的工艺方法,其特征是在水解步骤后进行沉淀处理,将水解浓缩液按下述三种沉淀方法之一进行沉淀处理:

(1)向提取物浓缩液中加入其 5~15 倍体积量的丙酮,在 10℃以下沉淀 24~48 小时,离心或滤取沉淀,沉淀置室温或鼓风烘房、箱除去残余有机溶剂,干燥得主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽;

(2)向提取物浓缩液中加入乙醇至终浓度为 55~90%,在 10℃以下沉淀 24~48 小时,离心或滤取沉淀,沉淀置室温或鼓风烘房、箱除去残余有机溶剂,干燥得主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽;

(3)向提取物浓缩液中加氯化钠至终浓度为 2.4~4.0 mol/L, 在 10℃以下沉淀 24~48 小时后,离心或滤取沉淀,用 95%乙醇洗涤脱水去盐,干燥得主要含 I 型、II 型和 III 型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽。

8. 权利要求 2 至 7 中任意一项所述的工艺方法所得到的河豚肽,其特征在于所得提取物中河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的总含量大于 40%, 总蛋白含量大于 70%。
9. 权利要求 2 至 7 中任意一项所述的工艺方法所得到的河豚肽作为有效成分在制备治疗和预防如下疾病的药物和保健食品中的应用:胃溃疡、酒精性胃溃疡和胃出血、酒精性胃粘膜损伤、药物性胃溃疡和胃出血、药物性胃粘膜损伤、应激性胃溃疡、急慢性胃炎、浅表性胃炎、糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛、胆汁返流性胃溃疡、十二指肠溃疡、结肠炎、消化道出血、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良、消化吸收不良引起的体重下降、腹胀、腹泻、酒精性肝损伤、酒精性脂肪肝和肝硬化、酒精性肝纤维化、肝硬化、肝纤维化、药物性肝损伤、免疫功能失调和下降、白细胞减少症、类风湿性关节炎、风湿性关节炎、红斑狼疮、消化道恶性肿瘤发生、发展和转移、胃癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、其它实体恶性肿瘤发生、发展和转移、新生血管生成性疾病、腰椎骨质增生、肺纤维化、肾纤维化、胶原蛋白病理性增生疾病。
10. 根据权利要求 9 所述的河豚肽作为有效成分在制备药物和保健食品中的应用,其特征不在于该药物和保健食品是口服制剂。

说明书

河豚肽的制备工艺及其医药保健用途

技术领域

本发明属于中药药品、生化药品、保健品领域。具体的说，本发明涉及以河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物为主要化学成分和活性成分的河豚鱼皮和/或鱼骨（鳍）之蛋白质多肽制品——河豚肽、河豚肽的制备工艺、河豚肽免疫学测定方法以及河豚肽作为有效成分的药品和保健食品的用途。

背景技术

关于河豚与河鲀的说明：

按照鱼类分类学，名词“河豚”为水生哺乳类，属鲸目(*Cetacea*)、河豚科(*Platanistidae*)，名词“河鲀”为硬骨鱼纲，属鲀形目(*Tetrodontiformes*)鲀科(*Tetrodontidae*)，两者进化阶元悬殊，分别隶属不同的纲、目。因此，它们是完全不同的两类鱼，本发明所用河豚属后一类，即硬骨鱼纲、鲀形目(*Tetrodontiformes*)之鲀科(*Tetrodontidae*)。所以，本发明所述河豚按鱼类分类学其实应该称作河鲀。但是时至今日，因各种历史原因和习俗，河鲀鱼被误称为河豚，并一直沿用下来。固本发明也使用了这一名称（①李时珍：《本草纲目》；②《康熙字典》；③《新华字典》；④《日华子本草》；⑤《辞海》；⑥李晓川等：《河豚鱼及其加工利用》，中国农业出版社，1998）。但是按照中国自然科学生理学和鱼类分类学审定名词规定，“河鲀毒素”一词中使用“鲀”，具体河鲀鱼种的学名中也用“鲀”。

关于河鲀毒素来源与河豚的毒性：

河豚有毒，这一点大多数人都知道。但是，很多人却不知道河鲀毒素并非河豚自身产生的，即河豚不会自己合成河鲀毒素。河豚属回游生物，每年4至6月是它们的排卵期，这时它们会从海洋游入内陆江河，产卵后又游回大海，河豚幼鱼也在当年游入海洋。实际上，河鲀毒素是由寄生于河豚体内的数种海洋微生物产生的，这些寄生性海洋微生物不存在于江河湖泊的淡水环境中，它们寄生于海洋中的河豚后合成并将河鲀毒素分泌屯集于河豚体内。在河豚体内除肉和精囊外，几乎所有其它组织和器官都含河鲀毒素，以卵巢、肝脏、皮肤和血液含量最高。河豚体内的河鲀毒素含量还与河豚品种和季节有关，一般从3月至7月末，河豚含毒量较高，其余时间含毒素较少，11月底至来年1月初降至最低点，此后又会回升，如此循环。此外，河鲀毒素在河豚体内含量水平还与其性腺发育程度有关，随着性腺的成熟，含毒量也逐渐升高，至排卵期达到最高（4至6月），排卵后毒性又逐渐下降，如此循环。英国、日本等多个实验室在这方面做了许多研究工作，发现在人工培养繁育条件下，河豚都无河鲀毒素毒性。进一步深入研究证实，河豚自身基因组及细胞内没有河鲀毒素生物合成所必需的基因簇和合成酶类（①Myoung-Ja Lee, et al. A Tetrodotoxin-Producing *Vibrio* Strain, LM-1, from the Puffer Fish *Fugu vermicularis radiatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Apr 2000; 66: 1698—1701; ②U Simidu, et al. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Oct 1990; 40: 331—336; ③UK HGMP Resource Centre—The Fugu Genomics Project: Origins of the Natural Toxin Tetrodotoxin. Aug. 2002。原文如下：
Increasing evidence are indicative that puffer fish do not have the genes coding for a pathway for the

synthesis tetrodotoxin molecules. David Berkowitz and Ilona Kryspin-Sorensen have reviewed some of this evidence in a publication entitled "Transgenic Fish: Safe to Eat". Some of the points raised follow. Puffer fish grown in culture do not produce tetrodotoxin until they are fed tissues from a toxin producing fish. The blue-ringed octopus found in Australian waters accumulates tetrodotoxin in a special salivary gland and infuses its prey with toxin by bite. This octopus contains tetrodotoxin-producing bacteria. Xanthid crabs collected from the same waters contain tetrodotoxin and paralytic shellfish toxin. Tetrodotoxin in algae species *Jania* is produced by a bacteria species *Alteromas*. Additionally, tetrodotoxin is similar in structure and mode of action to saxitoxin which is a neurotoxin produced by a marine micro-organism. Both tetrodotoxin and saxitoxin inhibit the activity of the voltage sensitive sodium channel in the same mode of action; and both molecules contain a guanidinium moiety. 松居隆. 化学と生物. 1984, 22: 679; 安元健. 化学と生物. 1986, 24: 6; 陈永豪. 河豚含毒与环境影响. 中国海洋药物杂志, 1990, 3: 8—9). 因此, 如果一条河豚鱼从未在海洋中生活过或从未接触过海水和海洋生物的话, 它是不会也不可能具有任何河豚毒素样毒性的, 反之, 则一定会携带剧毒—河豚毒素。即, 在淡水中人工繁殖饲养的河豚完全无毒。经我们实验室对人工淡水繁殖饲养的不同生长发育阶段河豚各种组织毒性的反复测定, 也证实了这一点。

关于胶原蛋白的生理生化和药理学:

目前已经发现了二十多种胶原蛋白, 都具有三股螺旋结构或部分三股螺旋结构。一般认为, 它们作为细胞外基质的主要成分, 起支撑, 连接, 保护和构成的作用, 是人体内含量最高的蛋白质, 几乎分布于所有器官和组织。目前, 依据胶原分子的形状和螺旋结构的交联特征可以分为以下几类: 经典的纤维状胶原 (包括 I、II、III、V、和 XI 型)。网状结构胶原 (包括 IV 型、VIII 型和 X 型)。在胶原纤维表面发现的和被认为具间断型胶原三股螺旋结构的交联纤维 (包括 IX、XII、XIV、XVI 和 XIX 型)。形成珠状肌原纤维的胶原 (VI 型)。基底膜上的锚着纤维胶原 (VII 型)。具有跨膜结构域的胶原 (包括 XIII 和 XVII 型)。新近发现的仅具有部分特征性的胶原 (包括 XV、XVIII 型) 以及具有三股螺旋域的胶原蛋白等 (Prockop, D.J. *Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64: 403—434; ② 成军: 《细胞外基质的分子生物学与临床疾病》, 北京医科大学出版社, 1999; ③ Ven Der Rest, M., et al. *Collagen family of proteins. FASEB J.*, 1991, 5: 2814—2823)。但是, 由于胶原族蛋白分子巨大、种类繁多和结构复杂, 迄今我们对胶原族蛋白质的生理生化、生物学功能和病理学意义尚未完全了解。

胶原 (collagen):

胶原的化学本质是蛋白质, 由十几种氨基酸按一定排列顺序组成的胶原亚基 (如 α 、 β 肽链等) 是构成胶原分子的亚单位。定向排列整齐的 3 条胶原亚基肽链之间, 通过共价键搭桥交联, 形成稳定的胶原微纤维不易溶解, 故纤维状胶原属于不溶性硬蛋白。但常有一部分未共价交联的胶原亚基可用中性盐或稀醋酸溶液提取溶解出来, 此部分称为可溶性胶原。纤维状胶原蛋白分子中的 3 条亚基肽链互相盘绕成胶原蛋白特有的左手三股螺旋构型。每个亚基如 α -肽链大约由 1000 个氨基酸残基组成, 每个亚基肽链分子量约 10 万, 故纤维状胶原蛋白分子量约为 30 万左右。

胶原分子的亚基肽链中有近三分之一的氨基酸残基为甘氨酸 Gly。在氨基酸排列顺序中, 每隔二个其它氨基酸残基即有一个 Gly 残基, 故整个结构可用 (甘氨酸-X-Y)_n 来表示, 式中 X、

Y 分别代表其它氨基酸, n 大约等于 330。此种有规律的结构是使 3 条 α -肽链接合形成三股螺旋结构的重要条件。胶原亚基肽链中含有羟脯氨酸 Pro-OH 和羟赖氨酸 Lys-OH 残基, 它们常在胶原 α -肽链的 Y 位置上出现。而不带羟基的脯氨酸 Pro 则常在 X 位置上出现。羟脯氨酸和 Pro 总数在胶原分子中约占 22% 左右, 也是维持胶原分子三股螺旋结构的重要组成部分。胶原分子中不含色氨酸 Trp 残基, 酪氨酸 Try 残基也很少。

如上所述, 胶原分子由三条螺旋型的肽链互相盘绕而成。每条肽链约由 1000 个氨基酸组成, 肽链和肽链之间, 由氢键联结来加以稳定。而在肽链的螺旋体上环绕分布着氨基、羟基、羧基和酰氨基。胶原之所以不溶于水, 就是由这个紧密、坚固的三螺旋体结构决定的。当胶原受热或水解时, 这个三链螺旋结构松散开来, 变成明胶分子的无序和不规则线团状肽链结构, 因而明胶能溶于水, 这时, 明胶分子的肽链不再是定向的螺旋型纤维了。

明胶 (gelatin):

胶原经过不可逆的变性作用和部分降解断裂所产生的产物称为明胶。即明胶是胶原的变性和部分降解产物, 由已失去原特定空间构型的无序胶原亚基肽链及其部分水解产物胶原多肽组成。胶原由有规则的结构转变为无规则的明胶需经过二个基本过程:

热变性过程 在此过程中, 胶原的多肽链之间由于加热引起氢键和静电性键的断裂, 从而引起胶原螺旋解体, 3 条缠绕的蛋白链互相松开, 进入溶液, 形成无规则的线团。但是这个过程仍然不足以把所有的胶原都转化为无规则的链。因为还有更稳定交联的胶原在该过程中并没有解除交联。

共价键交联的水解断裂 在工业生产明胶时, 这个过程必须发生在明胶制备工艺的熬胶之前, 该阶段的处理实际上是将胶原的一些肽键和交联体, 通过水解而从胶原本身中溶解到溶液中去。胶原中共价键的断裂与 pH 值和温度有关。断裂的位置决定了产物明胶分子量的大小、多肽链的数目等。

所以, 明胶系一种高分子蛋白质, 它是由十几种氨基酸按一定的方式组合而成的。明胶制品中出现的粘蛋白、糖醛酸和醛, 可能来源于粘多糖组织。但这些成分在制造明胶过程中会降解, 所以这些少量的非明胶成分不同于胶原制品中的非胶原成分, 但是胶原制品和明胶制品的主要化学成分是相同的, 即都是胶原性多肽。

已有大量研究文献证实, 皮肤和骨骼中的蛋白质主要是胶原蛋白。皮肤中存在的主要是 α 型和 β 型胶原蛋白, 它们占皮肤蛋白的 90% 左右。骨骼中主要是 α 型胶原蛋白, 软骨中主要是 α 型胶原蛋白, 它们占骨骼蛋白的 90% 以上。由于皮肤和骨骼来源广泛易得, 因此, 皮肤和骨骼 (包括软骨) 是提取制备明胶以及 α 、 β 和 γ 型胶原蛋白的最佳原料, 这一点已为本领域专业技术人员熟知且广泛应用 (Miller, E.J. et al., in: *Methods in Enzymol.*, vol. 82, Academic Press; Ven Der Rest, M., et al. Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 1991, 5:2814-2823; 施惠群等:《水产动物明胶》, 农业出版社, 1982; 成军:《细胞外基质的分子生物学与临床疾病》, 北京医科大学出版社, 1999)。

然而, 胶原蛋白依给药途径不同可产生截然相反的效果。如动物皮下注射 α 型胶原可诱发广泛性关节炎 (徐叔云:《药理实验方法学》第 2 版, 人民卫生出版社), 但是同样的胶原口服后, 却可治疗风湿和类风湿性关节炎 (中国专利: CN1070711C 等)。有人对此提出解释, 认为这是人体产生

免疫耐受。口服动物胶(阿胶、龟甲胶、黄鱼鳔胶)可调节、增强机体免疫功能,增强机体抵抗力,这早已为大众所知,但是药理作用机制不清楚。这些动物胶的化学本质为变性胶原蛋白及其部分水解产物。

已有大量研究证实,新血管生成在实体肿瘤的持续生长发展及转移过程中起重要作用(①Folkman, J. *Nat. Med.*, 1995 1:27—31; ②Brooks, P.C., et al. *Cell*, 1998, 92:391—400)。研究发现,对血管基底膜胶原蛋白合成的抑制可抗血管生成,说明胶原蛋白合成对血管组织的生成和生长是非常关键的(①Maragoudakis, M.E., et al. *Kidney Int.* 1994, 43:147—150; ②Haralabopoulos, G.G., et al. *Lab. Invest.* 1994, 71:575—582)。并由此产生了如 endostatin、angiostatin、restin 和 Arresten、Canstatin、Tumstatin 等具有抗血管生成作用的专利药物,它们都可抑制血管生成和实体肿瘤的生长和转移。Arresten、Canstatin、Tumstatin 的共同显著化学特征为它们都是胶原性多肽(美国专利:US95/05107; US00/00383 和 US99/13737)。胶原蛋白应用于医疗保健的另一重要制剂来自鲨鱼软骨胶原(属Ⅰ型胶原)。中国专利申请公开 CN 1314816A、CN1177927、国际专利申请公开 WO 95/32722 和 WO 96/23512 等多项专利申请中公开了鲨鱼软骨胶原提取物制备方法及其医疗用途,涉及鲨鱼软骨胶原提取物抗基质金属蛋白酶、抗新血管生成和抗肿瘤活性。市场现在已有大量各种鲨鱼软骨胶原制剂销售。

因此,胶原蛋白除具有支撑,连接,保护和构成的作用外,还有其它我们现在尚不了解的重要功能和作用机制。

关于河豚胶和明胶的制造工艺与用途:

明胶包括河豚胶(主要是河豚鱼皮明胶)的工业制造工艺技术主要有酸法、碱法和酶法技术,使用何种工艺主要取决于明胶的用途。但不论何种工艺技术,其生产过程一般包括以下主要工艺步骤:

(1) 原料的前处理

□.预处理:包括预检(除去杂物和腐败原料);分类(不同组织,新鲜、晒干或盐腌制的不同原料归类);漂洗;切块和脱脂(有机溶剂或水简单熬煮)。

□.除杂质和软化膨胀:主要有三种方法①酸处理:原料用盐酸进行浸渍处理,所用的酸除盐酸外,还有亚硫酸、磷酸和硫酸等。包括骨质原料的脱钙(目的在于除去骨质原料中的钙及其它盐类,使组织松软,以便使生产明胶所需物质生胶原释放出来),软质原料的膨胀(目的在于使皮、鳔等软质原料吸水膨胀,便于提取酸处理明胶)及水漂洗。一般需时几天至几周,期间需换酸数次。②碱处理(浸灰):原料用石灰乳浸渍处理的过程。其作用是提高胶原的胶解度,除去原料中的有机杂质和提高明胶的产量、质量。一般用石灰乳浸泡 15~50 天或更长,亦有用氢氧化钠, Na_2SO_4 或 Na_2CO_3 等无机碱,然后脱灰(包括水洗,酸中和及再水洗,需时 5~48 小时)。③酶处理:一般用链霉菌蛋白酶(pronase),中性蛋白酶,胰酶或胃蛋白酶等处理,需时 3~5 天,以除去非胶原蛋白。酶法处理工艺条件要求较高,否则严重影响明胶质量,故使用不多。

(2) 明胶的提取:熬胶

明胶的提取大多沿用古老的熬胶法,即制胶原料和水一起共热而转变成明胶的过程。熬胶是明胶生产的关键工序。经浸酸、浸灰或酶法处理后的原料,即可进行明胶的提取。提取方法大多采用水煮熬胶法,需熬胶 4~6 次,每次 1~4 小时。亦有使用高温高压熬胶,或两种方法结合使用的

熬胶工艺，目的均是为了提高出胶率和提高明胶质量。

(3) 胶液的处理: 包括过滤、浓缩、防腐、刮片和干燥成形，最后得到薄片状明胶，经粉碎后可得粉末状或颗粒状明胶或经喷雾干燥得到干粉。

文献报道了许多种河豚鱼皮胶生产工艺，其中一种如下所述:

把洗净的河豚鱼皮浸泡于含 CaO 1~2% 的石灰乳中。在春秋季节，一般浸 10~15 天，中间换灰 3~4 次。浸灰结束后，取出漂洗，用盐酸中和，并在 $\text{pH}3.5\sim4$ 的情况下保持 5~6 小时，再用水漂洗 7~8 小时，洗净后将皮放入熬胶锅内，加入适量的水（不要太多，因皮内已有大量的水），调节 $\text{pH}6\sim6.5$ ，然后，在 70°C 下熬胶 4 小时，放出胶液（头道胶）。渣再加入适量的水，在 0.5 公斤/厘米² 压力下再熬胶 2 次，每次 30 分钟，待压力等于 0 后，放出胶液。所得的胶液通过离心、浓缩、冷却、成形、干燥，制得成品。

上述生产工艺和其他发表文献制造的河豚胶有以下特点: (1) 都是变性胶原蛋白或胶原蛋白，以变性胶原蛋白为主并有部分水解; (2) 除胶原、明胶蛋白外，鱼皮其它蛋白含量很低，被浪费未利用; (3) 无河豚鱼骨、鱼鳍胶原蛋白; (4) 抗原性很低，原胶原蛋白所结合的糖类抗原决定簇基本被破坏; (5) 生物学活性和药理作用不明，除同下述其他明胶相似作为外科敷料或食品辅料等使用外，本身也未作为任何其他疾病的治疗和预防之药品、保健食品应用; (6) 工艺过程耗时太长（一个周期需 20~50 天左右）; (7) 产生大量三废; (8) 工艺过程对设备腐蚀性很大; (9) 长期大量服用的安全性不能保证; (10) 制备河豚纯胶原的相关实验室文献，工艺复杂，流程长，产率低，条件苛刻，有残留试剂，不能进行工业化大生产。（施惠群等:《水产动物明胶》，农业出版社，1982; 李晓川等:《河豚鱼及其加工利用》，中国农业出版社，1998; 邹胜祥:河豚鱼皮胶止血粉的试制及止血效果观察，*海洋药物*, 3: 16, 1988; 蒋挺大等:《胶原蛋白》，化学工业出版社，2001; Colowick, S.P., Kaplan, N.O., *Methods in Enzymol.*, vol.82、vol.144、vol.145, Academic Press Inc）。

水产动物胶主要来源于鱼皮、鱼鳔、鱼鳞、鱼骨、龟鳖甲等，化学上属于明胶类。水产动物明胶被广泛应用于食品、医药和工业。在食品中，常用作食品的胶凝剂、糖浆稳定剂、乳化剂、增稠剂、软糖的发泡剂、糖果等的粘合剂、酒类的澄清剂和香肠肠衣等。在医药工业方面，明胶有极其重要的应用，主要包括制作胶囊囊壳，软胶囊和滴丸外壳亦是由明胶制成。在药品片剂生产中，明胶常作为粘合剂，使用后利于固体药物压片成型。在生产药用栓剂和锭剂时，明胶常作为基质赋形剂使用。明胶经处理后，可制成明胶止血海绵、外科用（止血）粉剂，人工血管，人工神经管，补铬明胶，骨移植基质，促进钙吸收剂，氨基酸，可吸收性手术缝合线（不需拆线）和保护性敷料等，明胶在医学上的另一重要用途是制造血浆代用品，用于手术和急救伤员。明胶在工业上亦有许多重要应用，如制作高质量纸张（感光纸，晒图纸，图表纸，货币纸，照相纸等）；化妆品乳液的乳化剂和稳定剂；絮凝剂（用于污水处理，提炼铀矿等）；胶带纸和双面胶；细菌培养基；底片制造（x 光片、电影胶片和胶卷底片）；纺织工业和皮革工业中用于印染、上浆和上光等（施惠群等:《水产动物明胶》，农业出版社，1982; 蒋挺大等:《胶原蛋白》，化学工业出版社，2001; 中国申请专利公开:97199927; 97199928; 96198883 和 98112702 等）。

河豚鱼皮（鱼骨）由于有细刺和毒性（天然河豚鱼皮、鱼骨含有中等程度的河豚毒素），大多不作食用，一般用于医药和工业明胶制造以及皮革加工制造，医药和工业河豚胶（河豚鱼皮明胶）

已无细刺和河豚毒素，其用途十分广泛，可用于粘合剂，造纸，印刷，火柴，塑料，照相，细菌培养，医药植皮，止血海绵、止血粉和食品工业辅料用胶，但是，从未有过用于本发明之医药保健用途，制造工艺也与本发明的完全不同（①李晓川等：《河豚鱼及其加工利用》，中国农业出版社，1998；②邹胜祥：河豚鱼皮胶止血粉的试制及止血效果观察，*海洋药物*，3:16，1988；③施惠群等：《水产动物明胶》，农业出版社，1982）。

本发明所述河豚的鱼肉、鱼肝、卵巢、精囊、鱼胆、血和目均有药用记载。鱼肉：用于补虚，去湿气，胃病 胃出血，理腰脚酸软，去痔疾，杀虫。鱼肝：用于破溃淋巴结核，慢性皮肤溃疡，癌症治疗和镇痛，也有人用于治疗药物成瘾。卵巢：用于治疗疥癣虫疮，疮疖，无名肿毒，颈淋巴结核，乳癌等。精囊：用于提取鱼素、精氨酸和鱼精蛋白。鱼胆：用于提取牛磺酸，治疗脚气，烫伤，癣疥等。从河豚提取的河鲀毒素可应用于治疗关节炎，风湿病，瘙痒，阳痿，性欲低下，遗尿，破伤风，百日咳，气喘，头痛，肌肉痉挛，胃痉挛，破伤风痉挛，癌症镇痛，局部麻醉，药物成瘾，神经和关节疼痛和心率失常等。此外，民间将九斑刺鲀和六斑刺鲀的皮用于治疗水肿、咳嗽、遗精、阳痿、肝炎、哮喘、神经衰弱、小儿血尿和产后奶少。翻车鲀、矛尾翻车鲀和短吻三刺鲀的皮及肝油用于佝偻病、乳腺炎、外伤出血、水火烫伤、跌打损伤和中耳炎等。光兔鲀、棕腹刺鲀和绿鳍马面鲀的肉、皮和鳔炖服用于痢疾、咳嗽、乳腺炎和胃病（①潘心富：河豚药用研究概况。*药学通报*，1984,19（4）：34-37；②贾玉海：《中国海洋湖泊药物学》，学苑出版社，1996；③伍汉霖：《中国有毒鱼类和药用鱼类》，上海科学技术出版社，1978；④江苏新医学院：《中药大辞典》，上海人民出版社，1977；⑤《中国药用动物志》协作组：《中国药用动物志》，第一册，天津科学技术出版社，1979；⑥李晓川等：《河豚鱼及其加工利用》，中国农业出版社，1998）。

迄今为止，国内外对河豚胶用于如本发明所述医药保健用途的生物活性、药理作用及其作用机制尚无任何动物试验研究和临床应用报道。

关于相关疾病的病理生理学和药理学：

胃溃疡在人群中的发病率为 8~10%，属多发性常见慢性病。虽然消化性胃溃疡的病理学机制尚未完全了解，但是目前已经认识到下述三种主要的致病因素：（1）胃壁细胞分泌盐酸过多；（2）胃粘膜防御机能不全或受损和（3）幽门螺杆菌感染。针对上述病因，临床治疗消化性溃疡药物有 3 类：（1）减少胃酸分泌药或酸中和剂，包括 H_2 阻滞剂；质子泵抑制剂；乙酰胆碱拮抗剂以及酸中和剂；（2）胃粘膜保护剂，保护胃粘膜免受损伤；（3）抗生素，抗幽门螺杆菌感染。它们可分别作用于相应的胃溃疡致病病理过程（①李家泰：《临床药理学》第二版，人民卫生出版社，1999；②Katzung, B.G.: 《Basic & Clinical Pharmacology》7th edition, Appleton & Lange, 1999）。

刺激胃酸分泌的内源性物质主要有：乙酰胆碱、组胺和胃泌素，抑制胃酸分泌的内源性物质主要有生长抑素、5-羟色胺及前列腺素 E_2 和 I_2 等（①陈寿坡：《胃肠病临床药理学》，科学出版社，1998；②Mycek, M.J., et al: 《Pharmacology》2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2000）。它们与相应受体结合后分别通过胞内腺苷酸环化酶和抑制性 G 蛋白而最终影响壁细胞质子泵 H^+ ， K^+ -ATP 酶的活力而影响胃酸分泌。当刺激和抑制因素失去平衡时，胃酸和胃蛋白酶分泌过多，从而侵蚀胃壁和十二指肠形成溃疡、炎症和出血乃至穿孔，因此对乙酰胆碱、组胺和胃泌素有拮抗作用或可直接抑制质子泵 H^+ ， K^+ -ATP 酶活性的化合物可望成为新的抑制胃酸分泌类抗溃疡药

物如奥美拉唑、法莫替丁和派仑西平。

人的胃腔内含有较多的对胃粘膜有损害的物质,其中包括胃酸(盐酸)、胃蛋白酶、反流入胃腔的胆汁和胰液(含胰蛋白酶等多种蛋白水解酶)、以幽门螺旋杆菌为主的微生物、药物、饮酒和食物调料等。人胃壁细胞分泌 H^+ 浓度约为 $140\sim 145\text{mmol/L}$,比血液中高三四百万倍,十二指肠球部腔内 pH 也低至 2 左右。正常人的胃、十二指肠全天与腐蚀性很强的盐酸和能水解蛋白质的胃蛋白酶接触,同时又经常暴露在上述对粘膜有害的其他物质中,为何仍可不受损伤而保持其完整性?目前认为,这是由于胃、十二指肠粘膜具有多重复杂的粘膜防御机制,包括粘膜表面上皮和上皮细胞间的紧密接触(tight junction)、粘膜血流量、上皮细胞的再生与修复及多种生理活性物质对粘膜的细胞保护作用(mucosa cytoprotection)。具有胃粘膜细胞保护作用的生理活性物质有:前列腺素类 PGs 如 PGE_2 和 PGI_2 、碳酸氢盐(HCO_3^-)、源于构成型一氧化氮合酶(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)的一氧化氮(NO)、粘液、巯基化合物、胃肠道活性肽(生长抑素、降钙素基因相关肽和神经降压素等)和生长因子(表皮生长因子 EGF,成纤维细胞生长因子 FGF 和转化生长因子 α TGF $_{\alpha}$ 等)。PGs (PGE_2 , PGI_2 等)和源于 cNOS 的 NO 具有舒张血管、增加胃粘膜血流量和改善缺血性损伤的作用。当被粘膜损伤因素(如无水乙醇, 0.6N 盐酸, 0.2N 氢氧化钠, 25% NaCl, 非甾体抗炎药, 源于诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活力升高引起的胃粘膜组织中 NO 含量的病理性升高和 iNOS 基因大量表达以及缺血等)作用后,胃粘膜防御机能完整性受到损伤,粘膜保护活性物质在胃粘膜中的水平下降,将使粘膜糜烂和坏死,引起大面积溃疡和广泛性深度出血,甚至胃穿孔(①陈寿坡:《胃肠病临床药理学》,科学出版社,1998;②萧树东:《消化病学新理论与新技术》上海科技教育出版社,1999;③ Robert, A., et al. Cytoprotection by Prostaglandins in rats. *Gastroenterology*, 1979, 77:433—443;④ Kroncke, K.D., et al. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 1998, 113:147—156)。反之,如某物质可促进上述粘膜防御机能和升高细胞保护活性物质水平则可能被开发为粘膜保护类抗溃疡药。目前临床使用胃溃疡治疗药物以上述抗酸药加抗生素和胃粘膜保护剂为主,主要存在问题是疗程长、用药多、效果差、各药作用(机制)单一、复发率高和有一定副作用。因此研究开发高效、速效、长效和副作用少的胃溃疡治疗药物是世界各大制药公司极其重视的项目和目标。

全球药物滥用之首当属酒精滥用(酗酒及摄入过多),包括中国、日本和欧美国家。酒精滥用可造成巨大社会、家庭和个人健康伤害,如酗酒闹事、犯罪,家庭暴力,酒精中毒和酒精性疾病,其后果非常严重且难以控制。酒精滥用是酒精性胃溃疡、酒精性胃出血、酒精性肝纤维化(可演化为肝硬化)和酒精性脂肪肝等疾病的主要病因。目前虽然有一些药物可用于戒酒,但是由于这些药物的副作用和药物反应太大以及饮酒者心理抵抗和酒精成瘾性,加上社会因素和传统生活饮食习惯,酒精戒断几乎不可能。亦有一些药物可用于肝保护和胃粘膜保护,但是存在用药时间长、药效不理想和药物起效慢等缺陷。所以研究开发饮酒前和饮酒后治疗与预防酒精性疾病高效速效低毒药物成为必要。从这一点来讲,迫切期待开发出本发明的河豚肽。

临床肝纤维化,脂肪肝,肝硬化属严重肝脏疾病,其主要分子病理学特征是肝组织中胶原蛋白异常增多和沉积。乙醇和许多药物及化学品,如对乙酰氨基酚和四氯化碳可诱发临床或实验性肝纤维化、脂肪肝或肝硬化,造成肝组织中胶原蛋白异常增多和肝损伤,肝硬化可进一步发展引起

肝癌 (①Prockop, D.J. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64:403—434; ② Muriel, P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem. Pharmacol.*, 1998, 56:773—779; ③江正辉:《酒精性肝病》中国医药科技出版社, 2001)。

临床化疗的最大问题之一是化疗后的副作用, 往往给患者造成巨大的生理和心理伤害, 这种伤害有时甚至会超过肿瘤本身造成的伤害。常见的化疗副作用有严重胃肠道反应, 体重下降, 免疫力下降, 白细胞数减少, 毛发脱落和抵抗力迅速下降等。因此, 升高白细胞数, 增强体质和机体免疫力, 改善胃肠道功能和提高生活质量的药物和保健品的应用是克服化疗副作用, 提高化疗效果的另一有效途径。本发明正是基于这种背景和需求而产生的。

发明内容

本发明所要解决的技术问题:

本发明的目的是, 给出一种用河豚鱼皮和/或包括鱼鳍在内的鱼骨制备的以河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物为主要化学成分和活性成分的蛋白质多肽制品——河豚肽, 以及河豚肽的制备工艺。

本发明进一步的目的是, 给出以河豚肽为有效成分制备的药品和保健食品的医疗保健用途。

本发明同时公开了由河豚肽原药制备药品和保健食品的各种口服制剂及其制备工艺。

本发明的技术解决方案如下:

本发明涉及一种用河豚鱼皮和/或包括鱼鳍在内的鱼骨制备的以河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物为主要化学成份和活性成份的蛋白质多肽制品——河豚肽。

本发明还涉及一种用河豚鱼皮和/或包括鱼鳍在内的鱼骨制备河豚肽的工艺方法, 它包括以下步骤:

(1)原料预处理: a.天然河豚鱼皮、鱼骨原料的脱毒预处理: 一份原料加入 5~20 重量份的酸液或碱液, 使达终浓度为 0.1 至 2.0 mol/L, 在室温~100℃下处理 30 分钟~48 小时, 充分水洗, 刮除或不刮除鱼皮表层色素, 如此重复 4 至 6 次; b.依次用自来水和去离子水将人工淡水饲养繁育的河豚鱼皮、鱼骨原料及脱毒后的天然河豚鱼皮、鱼骨原料洗净, 冷藏备用。经预处理后的原料可于-18℃以下冷冻, 长期保存。此步骤主要特征在于提取原料使用了河豚鱼皮、鱼骨和鱼鳍以及脱毒处理, 这一点是河豚肽制备工艺的高效率以及产品安全性、高效性和多效性之基础。而河豚胶传统制备工艺仅使用河豚鱼皮作为提取原料, 而且对脱毒是否完全没有进行控制与要求。

(2)提取: 可以按下述三种提取方法之一进行: a. 向预处理后的河豚鱼皮、鱼骨为任意比例的一重量份原料加入 2~20 重量份水或酸液, 提取时酸液的使用终浓度为 0.001 至 2.0 mol/L, 在室温~125℃、常压至 3 个大气压下, 提取 30 分钟~100 小时, 滤取液态部分, 刮除或不刮除鱼皮表层色素, 如此重复 0~6 次, 合并滤液, 若需要可加碱中和并经超滤、透析或分子筛脱盐, 将残渣用水或与滤液合并粉碎匀浆得淡黄色或灰色匀浆液; b.向预处理后的一重量份河豚鱼骨原料加入 2~20 重量份水或酸液, 提取时酸液的使用终浓度为 0.001 至 2.0 mol/L, 在室温~125℃、常压至 3 个大气

压下, 提取 30 分钟~100 小时, 滤取液态部分, 如此重复 0~6 次, 合并滤液, 弃去残渣, 将滤液浓缩至原体积的 100%至 5%后, 加入适量河豚鱼皮原料, 在室温~125℃, 常压至 3 个大气压下, 提取 30 分钟~100 小时, 滤取液态部分, 再加水或同样的酸液提取, 如此重复 0~6 次, 合并滤液, 若需要可加碱中和并经超滤、透析或分子筛脱盐, 将残渣与滤液合并后粉碎匀浆得淡黄色或灰色匀浆液; c. 向预处理后的河豚鱼皮、鱼骨为任意比例的一重量份原料加入 2~20 重量份无机碱液, 提取时碱液的使用终浓度为 0.001 至 2.0 mol/L, 在 45℃~85℃下加热提取 30 分钟~48 小时, 滤除碱处理液, 如此重复 0~3 次, 用水洗净残余碱液, 若需要可加酸中和, 水洗, 然后加水匀浆, 得淡黄色或灰色匀浆液。该步骤从预处理后的河豚鱼皮和鱼骨(鳍)以任意比例组成的混合物中直接提取获得河豚肽提取液, 或先从鱼骨(鳍)中获得提取液, 然后再以该提取液为提取溶剂从鱼皮中提取获得河豚肽提取液。此步骤主要特征在于用提取溶剂进行直接提取, 从而保证了本发明工艺的周期短和高效率。

(3) 浓缩: 匀浆液经滤网过滤、板框压滤、6000~15000 转/分离心沉淀或离心过滤等方法去渣, 滤液经超滤、减压或常压浓缩等方法浓缩至原体积的 100%至 5%后, 得淡黄色或灰色提取物浓缩液;

(4) 干燥粉碎: 提取物浓缩液经喷雾干燥、冷冻干燥, 或者烘干、阴干后粉碎至 80 目以上, 得淡黄色或白色粉状提取物——主要含□型、□型和□型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽。在干燥步骤, 如使用冷冻干燥技术进行干燥, 则所得河豚肽冻干粉色泽较好, 可为白色。如使用喷雾干燥技术进行干燥, 则所得河豚肽干粉为淡黄色。喷雾干燥条件为进风温度 190~350℃, 出风温度为 70~150℃; 冷冻干燥条件为-40℃预冻, 干燥压力为 10~35 Pa, 升华干燥温度为-35℃~-5℃。

在上述提取步骤的浓缩步骤后可以按下述三种水解方法之一进行控制性部分水解处理: a. 蛋白水解酶水解, 条件: 反应体系中的蛋白水解酶浓度为 1mg/L 至 250 mg/L, 搅拌, 温度为 30℃ 至 65℃, 时间为 30 分钟至 100 小时; b. 有机酸和/或无机酸水解, 条件: 反应体系中的酸浓度为 0.001 mol/L 至 2.0 mol/L, 搅拌, 温度为室温至 100℃, 时间为 30 分钟至 72 小时; c. 无机碱水解, 条件: 反应体系中的碱浓度为 0.001 mol/L 至 2.0 mol/L, 搅拌, 温度为室温至 100℃, 时间为 30 分钟至 72 小时; 再将水解液浓缩, 干燥得主要含□型、□型和□型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽。在浓缩步骤后进行的水解处理, 其特征是将匀浆液浓缩至原体积的 100%至 5%后, 运用蛋白水解酶水解、有机酸或无机酸水解以及无机碱水解三种方法之一进行控制性部分水解。用□型、□型或□型胶原酶, 胰蛋白酶进行控制性部分水解所得制取物药理活性非常高。

在上述提取步骤的浓缩步骤或水解步骤后, 也可以按下述三种沉淀方法之一进行沉淀处理: a. 向提取物浓缩液中加入其 5~15 倍体积量的丙酮, 在 10℃以下沉淀 24~48 小时, 离心或滤取沉淀, 沉淀置室温或鼓风烘房、箱除去残余有机溶剂; b. 向提取物浓缩液中加入乙醇至终浓度为 55~90%, 在 10℃以下沉淀 24~48 小时, 离心或滤取沉淀, 沉淀置室温或鼓风烘房、箱除去残余有机溶剂; c. 向提取物浓缩液中加氯化钠至终浓度为 2.4~4.0 mol/L, 在 10℃以下沉淀 24~48 小时, 离心或滤取沉淀, 用 95%乙醇洗涤脱水去盐。上述三种方法所得的沉淀物经干燥得主要含□型、□型

和□型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽。

本发明亦可以将上述沉淀方法 c 所得沉淀复溶于浓度为 0.1~1.0mol/L 浓度的醋酸或盐酸溶液, 加氯化钠至 1.0~1.7 mol/L 终浓度, 在 10℃ 以下沉淀 24~48 小时, 离心或滤取白色沉淀, 用 95% 乙醇洗涤脱水去盐, 干燥得主要含□型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽。进一步可向上述离心上清中补加氯化钠至 2.4~4.0 mol/L 终浓度, 于 10℃ 沉淀 24~48 小时后, 离心或滤取白色沉淀, 用 95% 乙醇洗涤脱水去盐, 干燥得主要含□型、□型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物的河豚肽。用氯化钠进行沉淀或分级沉淀, 可分别获得□型、□型和□型河豚胶原蛋白或其变性胶原蛋白以及它们的混合物及其部分水解产物。

本发明的河豚肽, 经用 Kivirikko 法、克氏定氮法和 Lowry 法测定, 其河豚胶原蛋白和/或其变性胶原蛋白及其部分水解产物的总含量大于 40%, 总蛋白含量大于 70%。

本发明的河豚肽制备工艺所用的水为去离子水, 酸液为有机酸或无机酸液, 碱液为无机碱液, 酸、碱液及蛋白水解酶各有多种。作为具体的例子, 可以举出: 甲酸, 醋酸, 丙酸, 丙二酸, 丁酸, 丁二酸, 苹果酸, 枸橼酸, 酒石酸, 乳酸, 磷酸, 盐酸, 硫酸, 硝酸; 氢氧化钠, 氢氧化钾, 氢氧化钙 (石灰水), 碳酸钠; 胰蛋白酶, 胰酶, 胃蛋白酶, 木瓜蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶, 菠萝蛋白酶、中性蛋白酶, 链霉菌蛋白酶, 凝血酶, 明胶酶, 胶原酶□, 胶原酶□, 胶原酶□, 蛋白酶 K 及其它动、植物和微生物来源的其它各种蛋白水解酶。

本发明所述河豚系指: 鱼类分类学中鲀亚目 (*Tetraodontoidei*) 鲀科 (*Tetraodontidae*) 东方鲀属 (*Fugu*) 中所有东方鲀鱼种, 包括: 暗纹东方鲀 (*Fugu obscurus*)、红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*)、假睛东方鲀 (*Fugu pseudommus*)、条纹 (黄鳍) 东方鲀 (*Fugu xanthopterus*)、菊黄东方鲀 (*Fugu flavidus*)、墨绿东方鲀 (*Fugu basilewskianus*)、网纹东方鲀 (*Fugu reticularis*)、紫色东方鲀 (*Fugu porphyreus*)、虫纹东方鲀 (*Fugu vermicularis*) 双斑东方鲀 (*Fugu bimaculatus*)、豹纹东方鲀 (*Fugu pardalis*)、星点东方鲀 (*Fugu niphobles*)、铅点东方鲀 (*Fugu albopumbeus*)、横纹东方鲀 (*Fugu oblongus*)、弓斑东方鲀 (*Fugu ocellatus*)、圆斑东方鲀 (*Fugu orbimaculatus*)、晕环东方鲀 (*Fugu coronoidus*) 等东方鲀; 叉鼻鲀属 (*Arothron*) 河豚, 如星斑叉鼻鲀 (*Arothron stellatus*)、纹腹叉鼻鲀 (*Arothron hispidus*)、黑斑叉鼻鲀 (*Arothron nigropunctatus*) 等; 以及以下河豚鱼种类, 包括密沟鲀 (*Liosaccus cutaneus*)、粒突箱鲀 (*Ostracion tuberculatus*)、翻车鲀 (*Mola mola*)、矛尾翻车鲀 (*Masturus lanceolatus*)、短吻三刺鲀 (*Triacanthus brevirostris*)、尖吻三刺鲀 (*Triacanthus strigilfera*)、革鲀 (*Alutera monoceros*)、九斑刺鲀 (*Diodon novemaculatus*)、六斑刺鲀 (*Diodon holacanthus*)、密斑刺鲀 (*Diodon hystix*)、斑鳍短刺鲀 (*Chilomycterus affinis*)、暗鳍腹刺鲀 (*Gastrophysus gloveri*)、月腹刺鲀 (*Gastrophysus lunaris*)。

上述河豚可来自天然海洋, 江河及湖泊, 或经人工繁育的河豚 (包括巴鱼)。

经我们对本发明的河豚肽药效学和药理学的大量动物试验研究, 发现河豚肽具有多种药理作用和生物活性。其中一些试验如下:

- (1). 河豚肽对无水乙醇致大鼠胃粘膜损伤的保护作用。
- (2). 河豚肽对幽门结扎大鼠 (Shay 模型) 胃溃疡的作用。

- (3). 河豚肽对醋酸灼烧型大鼠胃溃疡的作用。
- (4). 河豚肽对利血平诱发的小鼠胃溃疡的作用。
- (5). 河豚肽对消炎痛诱发的大鼠胃溃疡的预防作用。
- (6). 河豚肽对大鼠乙醇急性肝损伤的保护作用。
- (7). 河豚肽对 CCl_4 诱发的大鼠肝损伤的保护作用。
- (8). 河豚肽对环磷酰胺诱发的小鼠白细胞数下降的影响。
- (9). 河豚肽对大鼠酒精性脂肪肝的影响。
- (10). 河豚肽在大鼠体内的药效动力学试验。
- (11). 河豚肽对小鼠胃排空的影响。
- (12). 河豚肽对消炎痛诱发的溃疡大鼠胃粘膜中前列环素-6-K 水平的保护作用。
- (13). 河豚肽对乙酰胆碱 (Ach) 刺激胃酸分泌的抑制作用。
- (14). 河豚肽对吗啉美辛胃溃疡大鼠胃粘膜中 PGE_2 含量的影响。
- (15). 河豚肽对大鼠十二指肠溃疡的影响。
- (16). 河豚肽对幽门结扎 (Shay) 大鼠血清胃泌素的影响。
- (17). 河豚肽对乙醇性胃溃疡大鼠胃粘膜 NO 含量、iNOS 活力以及 iNOS 和 cNOS 基因表达水平的影响。
- (18). 河豚肽抗鸡胚血管生成 (CAM) 试验。
- (19). 河豚肽抑制明胶酶 (GIA) 活力试验。
- (20). 淡水人工繁殖饲养河豚的毒性测定。
- (21). 河豚肽急性毒性试验。
- (22). 河豚肽长期毒性试验。

由此对本发明的河豚肽的药理作用和药效学得出如下重要结论:

- (1). 河豚肽呈剂量依赖性对无水乙醇诱发的大鼠胃粘膜损伤有极显著保护作用。
- (2). 河豚肽呈剂量依赖性对 Shay 大鼠胃溃疡有极显著预防作用。说明河豚肽对胃酸性胃溃疡有显著性预防治疗作用。
- (3). 河豚肽呈剂量依赖性对醋酸灼伤型胃溃疡有极显著治疗作用。说明河豚肽对慢性胃溃疡有治疗作用, 可显著促进溃疡部位的愈合。
- (4). 河豚肽呈剂量依赖性对利血平诱发的小鼠胃溃疡有极显著预防治疗作用。说明河豚肽对脾虚性胃溃疡有显著预防治疗作用。
- (5). 河豚肽呈剂量依赖性对消炎痛诱发的大鼠胃溃疡有极显著预防治疗作用。说明河豚肽对非甾体抗炎药引起的胃粘膜损伤溃疡有显著预防治疗作用。河豚肽对胃粘膜损伤的保护作用可能是通过升高胃粘膜 PGE_2 含量实现的。
- (6). 河豚肽呈剂量依赖性对大鼠无水乙醇急性肝损伤有极显著保护作用。
- (7). 河豚肽呈剂量依赖性对大鼠四氯化碳急性肝损伤有极显著保护作用。
- (8). 河豚肽呈剂量依赖性升高环磷酰胺诱发的小鼠血液白细胞数下降。说明河豚肽可增强机体免疫能力, 降低化疗药物的副作用。

- (9).河豚肽呈剂量依赖性抑制酒精性脂肪肝大鼠肝脏和胃壁层胶原蛋白含量的病理性升高。表明河豚肽可抑制胶原蛋白在肝脏和胃中的病理性合成。
- (10).河豚肽在给药后 30 分钟即达最大药效的 96.81%，说明河豚肽起效迅速。而且河豚肽在给药后 18 小时仍保持最大药效的 77.78%，说明河豚肽具有长效性。
- (11).河豚肽呈剂量依赖性对小鼠胃排空和溴吡斯地明促进胃排空作用有极显著抑制作用。说明河豚肽可阻断乙酰胆碱的作用，抑制乙酰胆碱对胃平滑肌的收缩刺激。延长食物在胃肠道中的滞留时间，促进食物的消化吸收。
- (12).河豚肽可显著升高消炎痛引起的前列环素-6-K 水平降低，实现其胃粘膜细胞保护作用。
- (13).河豚肽呈剂量依赖性对乙酰胆碱刺激的大鼠胃酸分泌有极显著抑制作用，而且对基础胃酸分泌也有显著抑制作用。说明河豚肽对乙酰胆碱的阻滞作用是其抗胃溃疡作用重要机制之一。
- (14).河豚肽呈剂量依赖性对 PGE_2 含量有显著升高作用。揭示河豚肽保护、维持胃粘膜 PGE_2 水平和胃粘膜血流量，是其抗溃疡作用和胃粘膜细胞保护机制之一。
- (15).河豚肽对盐酸组胺和吲哚美辛诱发的大鼠十二指肠溃疡有极显著的预防作用。
- (16).河豚肽呈剂量依赖性对 Shay 大鼠血清胃泌素水平升高有显著抑制作用。揭示河豚肽可抑制胃泌素刺激的胃酸分泌，是其抗溃疡作用的重要机制之一。
- (17).一方面，河豚肽呈剂量依赖性极显著降低乙醇损伤大鼠胃粘膜中 NO 水平、iNOS 活力以及 iNOS 基因表达水平，并使 NO 含量和 iNOS 活力极显著降低至正常水平以下。同时另一方面，河豚肽极显著升高乙醇诱发的 cNOS 基因表达水平下降，并恢复至正常水平。表明河豚肽对胃粘膜 NO 水平、iNOS 活力、iNOS 和 cNOS 基因表达的差别调节，是其胃粘膜保护、预防和治疗胃溃疡的重要机制之一。
- (18).河豚肽可显著抑制鸡胚新生血管的发生。
- (19).河豚肽可显著抑制明胶酶的活性。
- (20).淡水人工繁育河豚在各个生长阶段无毒。
- (21).河豚肽高度安全。
- (22).河豚肽可长期口服，安全有效。大剂量服用可增加机体体重，增加机体免疫器官重量，提高机体免疫力。

因此，本发明的河豚肽对各种因素诱发的动物胃溃疡、十二指肠溃疡具有极显著的预防和治疗效果。河豚肽可显著抑制诱导型一氧化氮合酶 iNOS 活力及其基因表达，抑制胃粘膜组织中 NO 含量的病理性升高，显著升高构成型一氧化氮合酶 cNOS 的活力及其基因表达，升高源于 cNOS 的一氧化氮水平，保护胃粘膜；抑制胃泌素的分泌；抑制乙酰胆碱、组胺等引起的胃酸分泌；升高胃粘膜中前列腺素 E_2 (PGE_2) 和前列环素-6-K 水平；抑制胶原蛋白在肝脏等组织中的病理性沉积；抑制新血管生成和基质金属蛋白酶活力；降低乙醇和药物诱发升高的转氨酶水平和升高化疗药物引起的血液白细胞数降低等多种生物学活性。因此河豚肽可应用于但不限于如：消化系统疾病（如胃溃疡、胃肠道功能紊乱、胃炎、肠炎、各种因素引起的肝损伤、脂肪肝等）、免疫性疾病（如白细胞减少症等）和肿瘤（如胃癌和结肠癌的发生、转移和生长）等疾病的治疗和预防性药品及保

保健食品的制备。还涉及用于有 cNOS、iNOS、NO、胶原、新血管生成、基质金属蛋白酶、胃泌素、乙酰胆碱、组胺、前列环素-6-K 和 PGE₂ 参与的疾病的预防和治疗性药物及保健食品的制备。

可以用公知的方法制成河豚肽药物和河豚肽保健食品各种形式的口服制剂。作为具体的剂型，可以举出：片剂（包括糖衣片、包衣片、素片、含片、泡腾片和咀嚼片），胶囊剂（包括软胶囊、微囊），颗粒剂，冲剂，泡腾颗粒剂，散剂（包括冻干粉），丸剂（包括滴丸），控释片剂（包括肠溶片剂，缓释片剂），控释胶囊剂（包括肠溶胶囊剂，缓释胶囊剂），果味制剂，咀嚼块，咀嚼条，含块，口服液，糖浆剂，口腔崩解剂，混悬剂，喷雾剂，溶液（包括汤剂），悬液，凝胶剂，霜剂，乳剂，膏剂，滴剂等。

上述制剂可以按公知的药物制剂学的制法与药理学和食品工艺学上允许用于制剂的载体、赋形剂、崩解剂、润滑剂、着色剂、调味剂等一起作为河豚肽药品、河豚肽保健食品组合物制成制剂。作为适用于固体制剂中的载体及赋形剂，可以作为例子举出：乳糖、葡萄糖、白糖、甘露醇、马铃薯淀粉、玉米淀粉、碳酸钙、磷酸钙、硫酸钙、结晶纤维素、甘草粉、龙胆粉等。作为粘合剂，可以作为例子举出：淀粉、明胶、糖浆、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯基吡咯烷酮、羟丙基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素等。作为崩解剂，可以作为例子举出：淀粉、琼脂、明胶粉、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、结晶纤维素、碳酸钙、碳酸氢钠、藻酸钠等。作为润滑剂，可以作为例子举出：硬脂酸镁、加氢植物油、聚乙二醇等。作为着色剂，例如有允许向医药品中添加的叶绿素铜钠、红色 2 号、黄色 2 号、蓝色 1 号等。作为调味剂，可作为例子举出：薄荷、橙味香精、香芋香精、阿斯巴甜、甜叶菊甙等。

片剂、胶囊和颗粒剂可以根据需要使用下述物质进行包衣：白糖、羟丙基纤维素、精制虫胶、明胶、山梨糖醇、甘油、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、苯二甲酸纤维素醋酸酯、羟丙基甲基纤维素苯二甲酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸聚合物等。

作为适用于河豚肽液体制剂中的载体、表面活性剂、助悬剂、着色剂、调味剂、稳定剂、消泡剂、抑菌剂、抗氧剂及赋形剂（增稠剂），可以作为例子举出：水、硬脂酸、月桂酸、阿洛索-OT、司盘类、吐温类、薄荷油、香精油类、阿斯巴甜、甜菊甙、甘草甜素、冰糖、黄酒、阿拉伯胶、西黄蓍胶、海藻酸钠、白及胶、果胶、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙二醇 400、明胶、琼脂、抗坏血酸、依地酸二钠等。

本发明的有益效果如下：

本发明有以下 12 项显著特征：

1. 本发明的河豚肽制造工艺是全新的，从未有过的，也未在文献上发表过，不同于河豚胶的所有其它制造工艺；
2. 本发明的河豚肽制造工艺周期短（一般 1~4 天）、产率高、药理活性高、成本低、易于实施，因而是简便、高效、切实可行的，适合大规模工业化生产；
3. 本发明的河豚肽除主要含有的河豚鱼皮、鱼骨（鳍）胶原蛋白和/或河豚明胶蛋白外，河豚鱼皮、鱼骨（鳍）的其它活性成分也可被提取，因而具有多种预料不到的生物学活性，因此河豚肽非常具有医药治疗和保健应用前景和价值；
4. 本发明的河豚肽不含河豚毒素，也无其它毒性，高度安全可靠，可长期口服或口腔含服；

5. 特别需要指出的是, 本发明的河豚肽之突出特点在于, 河豚肽对酒精性胃溃疡、酒精性胃粘膜损伤、酒精性胃出血、酒精性中毒、药物性胃溃疡、药物性胃粘膜损伤、药物性胃出血、十二指肠溃疡、急、慢性胃炎、浅表性胃炎、糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良、消化吸收不良引起的体重下降、腹胀和腹泻具有极显著的预防、治疗与保健作用。

河豚肽对各种因素诱发的动物胃溃疡、胃粘膜损伤、胃炎、胃出血、十二指肠溃疡、结肠炎具有极显著的预防和治疗效果。

河豚肽可极显著抑制胃泌素的分泌; 极显著抑制乙酰胆碱、组胺及胃泌素等刺激引起的胃酸分泌; 极显著抑制幽门结扎大鼠 (Shay) 胃酸、胃蛋白酶的分泌。表明河豚肽对胃酸性胃溃疡和胃酸过多症具有预防与治疗作用, 是高效抗胃酸分泌剂。

河豚肽可极显著升高胃粘膜中粘膜保护因子前列腺素 E_2 (PGE_2) 和前列环素-6-K 水平, 表明河豚肽可通过 PGs 途经保护胃粘膜, 舒张血管, 改善胃粘膜血流量, 对抗缺血性胃粘膜损伤和坏死。

河豚肽可极显著抑制诱导型一氧化氮合酶 iNOS 活力及其基因表达, 显著促进构成型一氧化氮合酶 cNOS 活力及其基因表达, 抑制胃粘膜组织中源于 iNOS 产生的 NO 含量的病理性升高, 升高源于 cNOS 产生的有益性 NO 含量, 表明河豚肽可保护胃粘膜, 舒张血管, 改善胃粘膜血流量, 对抗缺血性胃粘膜损伤和坏死, 抑制炎症和胃肠道肿瘤的发生。因此, 河豚肽是高效胃粘膜保护剂。

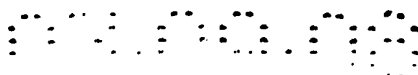
河豚肽具有显著的抑制胃排空作用, 从而可抑制胃痉挛、腹痛和腹泻;

6. 同时需要特别指出的是, 本发明的河豚肽之另一突出特点在于, 河豚肽可抑制胶原蛋白在肝、胃组织中的病理性沉积, 显著抑制明胶酶活性 (GIA 试验) 和抗新生血管生成 (CAM 试验), 说明河豚肽对机体组织胶原蛋白的非正常合成具有抑制作用, 可应用于酒精性肝损伤, 酒精性脂肪肝, 酒精性肝硬化, 酒精性肝纤维化、肺和肾组织纤维化、胶原增生性疾病、需新生血管生成疾病以及实体肿瘤发生、发展和转移的预防与治疗。

而且, 河豚肽可显著降低乙醇和药物诱发升高的血清转氨酶水平, 表明河豚肽可抵御酒精和药物对肝组织细胞的损伤作用。因此, 河豚肽具有高效肝保护作用;

7. 还要特别指出的是, 本发明的河豚肽之另一突出特点在于, 河豚肽可极显著升高化疗药物引起降低的血液白细胞数, 增加免疫器官胸腺的重量, 增加体重, 说明河豚肽可增强和调节机体免疫功能, 改善消化吸收, 增强体质, 减少化疗药物副作用。因此, 河豚肽具有高效免疫调节和保健作用。

因此河豚肽可应用于但不限于对如: 胃溃疡、酒精性胃溃疡、酒精性胃粘膜损伤、酒精性胃出血、酒精性中毒、药物性胃溃疡、药物性胃粘膜损伤、药物性胃出血、应激性胃溃疡、十二指肠溃疡、急性胃炎、慢性胃炎、浅表性胃炎、糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛、胆汁返流性胃溃疡、返流性食管炎、结肠炎、消化道出血、胃酸过多、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良、消化吸收不良引起的体重下降、腹胀和腹泻、酒精性肝损伤、酒精性脂肪肝、酒精性肝硬化、酒精性肝纤维化、肝硬化、肝纤维化和药物性肝损伤、免疫功能下降、白细胞减少症、风湿性关节



炎、类风湿性关节炎和红斑狼疮、消化道恶性肿瘤的发生、转移和增殖、新生血管生成性疾病、其它实体肿瘤的发生、转移和增殖、腰椎骨质增生、肺纤维化和肾纤维化、胶原蛋白增生性疾病等疾病的治疗、预防药物制备和保健食品作用。本发明的河豚肽所具有的这些药理活性和保健作用是新发现的，从未有过的，也未在文献上发表过；

8. 本发明的河豚肽具有多种极显著的药理活性和保健作用，即本发明的河豚肽具有高效性和多效性；

9. 本发明的河豚肽药理作用起效快，口服有效剂量半小时即可达最大药效的 95% 以上。因而本发明的河豚肽是速效的；

10. 本发明的河豚肽药效作用维持时间长，口服有效剂量 18 小时后仍可保持最大药效的 75% 以上。因而本发明的河豚肽是长效的；

11. 本发明的河豚肽可显著改善胃肠道消化功能，调节胃动力，促进消化吸收，较大剂量对生长期动物体重有显著的增加作用和促进生长作用；

12. 本发明的河豚肽制造工艺基本无三废。

因此，本发明之河豚肽（包括河豚胶原蛋白和/或其变性河豚胶原蛋白和河豚鱼皮、鱼骨所含非胶原蛋白及它们的部分水解产物）制备工艺是全新的、从未有过的和易于实现大规模工业化生产的，也未在文献上发表过，与所有其它河豚胶制造工艺完全不同。

本发明之河豚肽作为有效成分应用于治疗和预防如：胃溃疡、酒精性胃溃疡、酒精性胃粘膜损伤、酒精性胃出血、酒精性中毒、药物性胃溃疡、药物性胃粘膜损伤、药物性胃出血、应激性胃溃疡、十二指肠溃疡、急性胃炎、慢性胃炎、浅表性胃炎、糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛、胆汁返流性胃溃疡、返流性食管炎、结肠炎、消化道出血、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良、消化吸收不良引起的体重下降、腹胀、腹泻、酒精性肝损伤、酒精性脂肪肝、酒精性肝硬化、酒精性肝纤维化、肝硬化、肝纤维化、药物性肝损伤、免疫功能失调和下降、白细胞减少症、类风湿性关节炎、红斑狼疮、胃肠道恶性肿瘤发生、生长和转移、胃癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、新生血管生成、其它实体肿瘤生长、转移和增殖、基质金属蛋白酶活性、腰椎骨质增生、肺纤维化、肾纤维化、胶原蛋白病理性增生等疾病的药品、保健食品的制造和医药、保健应用是新发现的，从未有过的，也未在文献上发表过。经我们对河豚肽制备工艺学、药理学、药效学、毒理学、定性定量测定方法及质量分析和控制的大量研究，完成了本发明专利。

本发明所述术语“显著”或“极显著”乃是指按统计学上所定义的经适当统计学检验方法如 t 检验的 P 值小于 0.01 或 0.001 而言。

附图说明：

图 1 为本发明河豚肽的单向免疫扩散定性定量测定之沉淀环。

图 2 为本发明河豚肽的对流免疫电泳鉴别试验出现的沉淀环。

有关附图的具体内容将结合实施例说明。

具体实施方式：

由于河豚毒素在碱性条件下极不稳定，所以河豚肽制备原料鱼皮、鱼骨、鱼鳍的最佳脱毒方法是用碱液处理。由于河豚肽属于胶原蛋白和/或变性胶原多肽，所以河豚肽最佳提取方法是用水或酸液提取，最佳干燥方法是冷冻干燥，最佳水解方法是酶水解法尤其是用□、□或□型胶原酶水解，最佳沉淀方法是丙酮沉淀法（沉淀时间短、沉淀效率高、丙酮易于回收、产物中残余丙酮易于除净、鱼脂溶于丙酮中而除去）和氯化钠沉淀法（选择性高、产物色泽好）。由于河豚肽主要成分为蛋白质，易吸潮，因此其最佳口服制剂为颗粒剂、冲剂、冻干粉、片剂（包衣）、胶囊剂、口服液、滴丸、胶剂（胶片）等。河豚肽口服制剂的最佳用途是用于消化道疾病（胃溃疡、酒精性胃溃疡、酒精性胃出血、酒精性中毒、酒精性肝损伤、酒精性脂肪肝、酒精性肝硬化、酒精性肝纤维化、药物性胃溃疡、药物性胃出血、应激性胃溃疡、十二指肠溃疡、急、慢性胃炎、浅表性胃炎、糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛、胆汁返流性胃溃疡、结肠炎、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良、药物性肝损伤、胃癌、肝癌、结肠癌、直肠癌）、免疫功能失调和下降、白细胞减少症的治疗与预防。

下面是说明本发明专利的具体实施例，但是本发明专利不局限于下述这些实施例。如未作特别说明，下述实施例中所用河豚鱼皮、鱼骨（鳍）均来自淡水人工繁育饲养的河豚。

实施例 1：取河豚鱼皮 100 克，加去离子水 250ml，于 100℃加热提取 8 小时后，匀浆，匀浆液经过滤后，滤液真空浓缩至 150ml，在进风温度 260℃，出风温度 125℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

取该河豚肽干粉适量用 6N 盐酸于 110℃密封水解 24 小时，按 Kivirikko 方法测定羟脯氨酸含量并折算出胶原含量，结果表明该河豚肽胶原含量为 83%。

实施例 2：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1500ml，于 100℃加热提取 10 小时后，过滤，滤液真空浓缩至 250ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定，结果表明，该河豚肽胶原含量为 48%。

实施例 3：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1500ml，于 100℃加热提取 4 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 1500ml 同样提取，如此重复共提取 5 次，合并所有滤液，滤液真空浓缩至 250ml，在进风 280℃，出风 145℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 4：取河豚鱼皮 100 克，加去离子水 1000ml，于 120℃，2 个大气压力下，加热提取 30 分钟，匀浆，过滤，滤液真空浓缩至 150ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 5：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1500ml，于 125℃，3 个大气压力下，加热提取 2 小时，过滤，滤液备用，滤渣再加水 1000ml 同样提取，如此重复共提取 2 次，合并所有滤液，真空浓缩至 100ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 6：取河豚鱼皮 100 克，加去离子水 250ml，于 100℃加热提取 2 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 250ml 同样提取，如此重复共提取 5 次，最后用滤液将残渣匀浆，匀浆液经过滤后，真空浓缩至 150ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 7：取河豚鱼皮 100 克，加去离子水 250ml，于 80℃加热提取 12 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 150ml 同样提取，如此重复共提取 3 次，最后用滤液将残渣匀浆，匀浆液经过滤后，真空浓缩至 150ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 8: 取河豚鱼皮 100 克, 加去离子水 250ml, 于 100℃加热提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 250ml 同样提取, 如此重复共提取 3 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 150ml, 浓缩液中加醋酸至终浓度为 1.5mol/L, 于 80℃密闭水解 8 小时后, 在进风温度 220℃, 出风温度 100℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 9: 取河豚鱼皮 100 克, 加去离子水 250ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 250ml 同样提取, 如此重复共提取 2 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 150ml, 浓缩液中加醋酸至终浓度为 0.5mol/L, 于 50℃密闭水解 48 小时后, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 89%。

实施例 10: 取河豚鱼皮 100 克, 加去离子水 250ml, 于 100℃加热提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 250ml 同样提取, 如此重复共提取 2 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 150ml, 向浓缩液中缓慢加入 10 倍体积的丙酮, 边加边搅拌, 于 4℃放置 36 小时, 过滤即得河豚肽沉淀, 沉淀于 60℃通风烘箱中烘干后即得河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 83%。

实施例 11: 取河豚鱼皮 100 克, 加去离子水 250ml, 于 100℃加热提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 250ml 同样提取, 如此重复共提取 2 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 150ml, 加入无水乙醇, 边加边搅拌, 使乙醇终浓度为 85%, 于 10℃以下放置 48 小时以沉淀河豚肽, 离心或过滤即得河豚肽沉淀, 沉淀置不锈钢盘中凉干或于 35℃烘箱中烘干后, 粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 83%。

实施例 12: 取河豚鱼皮 100 克, 加去离子水 250ml, 于 100℃加热提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 250ml 同样提取, 如此重复共提取 5 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 150ml, 向浓缩液中加氯化钠至终浓度为 2.4mol/l 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀, 沉淀复溶于 0.1mol/L 盐酸中, 并加氯化钠至 1.7mol/L, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀和上清。沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 65℃循环风烘干或冷冻干燥, 得白色河豚肽干粉, 主要含有河豚III型变性胶原蛋白及其部分水解产物。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 90%。

向上述离心上清补加氯化钠至 2.4mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 主要含有河豚肽 I、II 型变性胶原蛋白及其部分水解产物。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 89%。

实施例 13: 取河豚鱼皮 100 克, 加去离子水 250ml, 于 100℃加热提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 250ml 同样提取, 如此重复共提取 3 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 150ml, 向浓缩液中加氯化钠至终浓度为 3.5mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取白色沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 45℃

通风烘干或冷冻干燥，得淡黄色或白色河豚肽干粉。

实施例 14: 取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1500ml，于 100℃加热提取 10 小时后，匀浆，过滤，滤液真空浓缩至 250ml，向浓缩液中加盐酸至终浓度为 1.0mol/L，于 60℃密闭水解 2 小时后，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 15: 取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1500ml，于 110℃，2 个大气压力下，加热提取，匀浆，过滤，滤液真空浓缩至 250ml，向浓缩液中加盐酸至终浓度为 0.005mol/L，于 50℃密闭水解 48 小时后，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 16: 取河豚鱼皮 150 克、鱼骨（鳍）500 克混合物，加去离子水 2000ml，于 95℃加热提取 10 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后，将提取液连同提取残渣匀浆，匀浆液经离心过滤后，所有滤液合并，80℃真空浓缩至 250ml。在进风温度 240℃，出风温度 85℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定，结果表明，该河豚肽胶原含量为 51%。

实施例 17: 取河豚鱼皮 150 克、鱼骨（鳍）500 克混合物，加去离子水 2000ml，于 95℃加热提取 10 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后，将提取液连同提取残渣匀浆，匀浆液经离心过滤后，所有滤液合并，80℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加盐酸至终浓度为 1.0mol/L，于 60℃密闭水解 5 小时后，加氢氧化钠中和至 pH6.5，在进风温度 320℃，出风温度 140℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 18: 取河豚鱼皮 150 克、鱼骨（鳍）500 克混合物，加去离子水 2000ml，于 95℃加热提取 10 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后，将提取液连同提取残渣匀浆，匀浆液经离心过滤后，所有滤液合并，80℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加盐酸至终浓度为 0.005mol/L，于 40℃密闭水解 72 小时后，在进风温度 220℃，出风温度 80℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 19: 取河豚鱼皮 150 克、鱼骨（鳍）500 克混合物，加去离子水 2000ml，于 95℃加热提取 10 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后，将提取液连同提取残渣匀浆，匀浆液经离心过滤后，所有滤液合并，80℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加盐酸至终浓度为 0.5mol/L，于 80℃密闭水解 2 小时后，在进风温度 300℃，出风温度 105℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 20: 取河豚鱼骨（鳍）500 克，河豚鱼皮 200 克，加去离子水 2500ml，于 110℃，2 个大气压力下，加热提取 1 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 2500ml 同样提取，如此共提取 5 次，最后用滤液将残渣匀浆，匀浆液经过滤后，真空浓缩至 350ml，向浓缩液中加盐酸至终浓度为 2.0mol/L，于 25℃密闭水解 4 小时后，加氢氧化钠中和至 pH6.5，在进风温度 220℃，出风温度 100℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 21: 取河豚鱼骨（鳍）500 克，河豚鱼皮 200 克，加去离子水 2500ml，于 95℃，加热提取 1 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 2500ml 同样提取，如此重复共提取 5 次，最后用滤液将残渣匀浆，匀浆液经过滤后，真空浓缩至 350ml，向浓缩液中加盐酸至终浓度为 0.1mol/L，于 75℃密闭水解 8 小时后，冷却，向水解液中缓慢加入 6 倍体积的丙酮，边加边搅拌，于 4℃放置 4

8 小时, 过滤即得河豚肽沉淀, 沉淀于 60℃通风烘箱中烘干后粉碎, 过 100 目筛, 即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 22: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 河豚鱼皮 200 克, 加去离子水 2500ml, 于 110℃, 2 个大气压力下, 加热提取 1 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 2500ml 同样提取, 如此重复共提取 4 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 350ml, 向浓缩液中加入盐酸至终浓度为 0.5mol/L, 于 65℃密闭水解 6 小时后, 冷却后, 加入无水乙醇, 边加边搅拌, 使乙醇终浓度为 85%, 于 10℃以下放置 48 小时以沉淀河豚肽, 离心或过滤即得河豚肽沉淀, 沉淀于 55℃通风烘箱中烘干后, 粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 23: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 河豚鱼皮 200 克, 加去离子水 2500ml, 于 120℃, 3 个大气压力下, 加热提取 1 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 2500ml 同样提取, 如此重复共提取 3 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 真空浓缩至 350ml, 向浓缩液中加入盐酸至终浓度为 0.001mol/L, 于 95℃密闭水解 8 小时后, 冷却后, 向水解液中加入氯化钠至终浓度为 4.0mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 36 小时, 离心取白色沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 55℃通风烘干或冷冻干燥, 得淡黄色或白色河豚肽干粉。

实施例 24: 取河豚鱼皮 150 克、鱼骨(鳍) 500 克混合物, 加去离子水 2000ml, 于 95℃加热提取 10 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后, 将提取液连同提取残渣匀浆, 匀浆液经离心过滤后, 所有滤液合并, 80℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加入盐酸至 pH2 和胰蛋白酶至 10mg/L, 于 54℃密闭水解 96 小时后, 在进风温度 195℃, 出风温度 110℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 25: 取河豚鱼皮 250 克、鱼骨(鳍) 500 克混合物, 加去离子水 3000ml, 于 95℃加热提取 10 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加去离子水 2000ml 同样提取 10 小时后, 将提取液连同提取残渣匀浆, 匀浆液经离心过滤后, 所有滤液合并, 80℃真空浓缩至 450ml。向浓缩液中加入盐酸至 pH1 和胃蛋白酶至 50mg/L, 于 35℃密闭水解 48 小时后, 加氢氧化钠中和至 pH6.5, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 68%。

实施例 26: 取河豚鱼皮 150 克、鱼骨(鳍) 500 克混合物, 加去离子水 2000ml, 于 95℃加热提取 10 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后, 将提取液连同提取残渣匀浆, 匀浆液经离心过滤后, 所有滤液合并, 80℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加入氢氧化钠至终浓度为 0.005mol/L, 于 95℃密封水解 6 小时后, 加盐酸中和至 pH6, 在进风温度 210℃, 出风温度 78℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 27: 取河豚鱼皮 150 克、鱼骨(鳍) 500 克混合物, 加去离子水 2000ml, 于 95℃加热提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 5 小时, 过滤, 如此重复共提取 4 次后, 将提取液连同提取残渣匀浆, 匀浆液经离心过滤后, 所有滤液合并, 70℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加入氢氧化钠至终浓度为 1.5mol/L, 于 40℃密封水解 2 小时后, 加盐酸中和至 pH6, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 54%。

实施例 28: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 河豚鱼皮 200 克, 加去离子水 2500ml, 于 110℃, 2 个大气压力下, 加热提取 2 小时后, 收集提取液, 残渣再用 2000ml 蒸馏水同样提取后, 粉碎匀浆, 离心或过滤后, 滤液与第一次提取液合并, 合并液真空浓缩至 200ml, 在进风温度 250℃, 出风温度 100℃条件下喷雾干燥后, 得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 29: 取河豚鱼皮 50 克, 加 0.1mol/L 醋酸 500ml, 于 30℃浸泡 96 小时, 倾去浸泡酸液, 用去离子水洗去剩余酸液后, 加蒸馏水 300ml, 匀浆, 匀浆液置于不锈钢盘中, 使匀浆液厚度<0.5cm, 于 20Pa, -10℃冷冻干燥, 得灰白色河豚肽冻干粉。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 91%。

实施例 30: 河豚鱼皮 50 克, 加 0.5mol/L 盐酸 500ml, 30℃浸泡 12 小时, 倾去浸泡酸液, 用去离子水充分洗去剩余酸液后, 加去离子水 300ml, 匀浆, 匀浆液置于不锈钢盘中, 使匀浆液厚度<0.5cm, 于 15Pa, -5℃冷冻干燥, 得灰白色河豚肽冻干粉。

实施例 31: 河豚鱼皮 50 克, 加 0.5 mol/L 苹果酸 500ml, 室温浸泡 8 小时, 滤取浸泡酸液备用, 用去离子水洗涤并刮去鱼皮表面色素层后, 重新加入上述浸泡酸液, 浸泡 24 小时后, 用去离子水充分洗涤, 匀浆, 向匀浆液中加入氯化钠至终浓度为 3.5 mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取白色沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 30Pa, 4℃冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉。

按 Kivirikko 方法测定, 结果表明, 该河豚肽胶原含量为 92%。

实施例 32: 河豚鱼皮 150 克, 加 0.2 mol/L 枸橼酸 1500ml, 25℃浸泡 6 小时, 滤取浸泡酸液备用, 用去离子水洗涤并刮去鱼皮表面色素层后, 重新加入上述浸泡酸液, 浸泡 24 小时后, 用去离子水充分洗涤, 匀浆, 向匀浆液中加入氯化钠至终浓度为 2.4 mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀, 沉淀复溶于 0.1 mol/L 盐酸中, 并加氯化钠至 1.4 mol/L, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀和上清。沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚α型胶原。离心上清补加氯化钠至 3.5 mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚肽α型胶原。

实施例 33: 河豚鱼皮 150 克, 加 0.5mol/L 丙二酸 1500ml, 室温浸泡 24 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入氯化钠至终浓度为 3.0 mol/L 后, 于 10℃放置沉淀 36 小时, 15000rpm 离心取沉淀, 沉淀复溶于 0.2 mol/L 醋酸中, 并加氯化钠至 1.4mol/L, 于 10℃放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀和上清。沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚α型胶原。离心上清补加氯化钠至 3.0mol/L 后, 于 10℃放置沉淀 36 小时, 离心取沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚肽α型胶原。

实施例 34: 取河豚鱼骨 500 克, 用 0.005mol/L 酒石酸 3500ml, 于 125℃, 3 个大气压力下, 加热提取 30 分钟, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加酒石酸 3500ml 同样提取, 如此重复共提取 3 次, 合并所有滤液与残渣, 匀浆, 过滤, 滤液于 50℃减压除酸并浓缩至约 200ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 35: 取河豚鱼骨 500 克, 用 1.5mol/L 丁二酸 4000ml, 于 80℃加热提取 3 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加丁二酸 3000ml 同样提取, 如此共提取 2 次, 合并所有滤液与残渣, 匀浆, 过滤, 滤液于 50℃减压浓缩至约 100ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。丁二酸

实施例 36: 取河豚鱼骨 1500 克, 用 1.0mol/L 醋酸 4500ml, 于 45℃加热提取 24 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加醋酸 4000ml 同样提取, 如此共提取 5 次, 合并滤液与残渣, 匀浆, 过滤, 滤液于 60℃减压浓缩至约 300ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 37: 取河豚鱼骨 550 克, 用 0.05mol/L 醋酸 4500ml, 于 95℃提取 10 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液于 60℃减压浓缩至约 200ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 38: 取河豚鱼骨 650 克, 用 0.1mol/L 醋酸 2000ml, 于 95℃加热提取 10 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液于 50℃减压除酸并浓缩至约 200ml, 向滤液中加入氯化钠至终浓度为 3.0 mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 36 小时, 离心取白色沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 15Pa, -5℃冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉。

实施例 39: 河豚鱼骨(鳍) 5000 克, 加 0.05mol/L 盐酸 50kg, 于 80℃加热提取 12 小时后, 将鱼骨连同酸液一起匀浆, 匀浆液放置 24 小时后离心过滤, 滤液于 60℃减压除酸并浓缩至约 2000ml, 加氯化钠至终浓度为 2.4mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 30Pa, -20℃冷冻干燥, 得白色河豚肽干粉, 此沉淀主要含河豚α和β型胶原蛋白及其部分水解产物。

实施例 40: 取河豚鱼皮 50 克, 用 0.5mol/L 醋酸 350ml 于 25℃浸泡 48 小时, 倾去酸液后, 用蒸馏水漂洗至近中性, 鱼皮中加入 250ml 去离子水匀浆, 匀浆液于 50℃减压除酸并浓缩至约 100ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 41: 取河豚鱼皮 50 克, 用 0.2mol/L 氢氧化钠 350ml 于 65℃加热提取 72 小时后, 充分水洗, 匀浆, 匀浆液于 60℃减压浓缩至约 80ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 42: 取河豚鱼皮 50 克, 用 1.5mol/L 碳酸钠 450ml 于 50℃浸泡提取 96 小时, 倾去碱液后, 用蒸馏水漂洗至近中性, 鱼皮中加入 250ml 去离子水匀浆, 匀浆液于 60℃减压浓缩至约 100ml, 在进风温度 200℃, 出风温度 90℃条件下喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 43: 取河豚鱼皮 50 克, 用 0.01mol/L 醋酸 350ml, 于 95℃加热提取 10 小时后, 匀浆, 匀浆液于 50℃减压除酸并浓缩至约 100ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 44: 取河豚鱼皮 50 克, 用 0.005mol/L 丙酸 350ml, 于 100℃提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加丙酸 250ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 最后用滤液将残渣匀浆, 匀浆液经过滤后, 于 50℃减压浓缩至约 100ml, 喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 45: 取河豚鱼皮 50 克, 用 0.005mol/L 醋酸 350ml, 于 125℃, 3 个大气压力下, 加热提取 30 分钟, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加醋酸 300ml 同样提取, 如此重复共提取 2 次, 合并所有滤液与残渣, 匀浆, 过滤, 滤液于 50℃减压除酸并浓缩至约 100ml, 在进风温度 300℃, 出风温度 120℃条件下喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 46: 取河豚鱼皮 50 克, 用 1.5mol/L 醋酸 350ml, 于 80℃加热提取 3 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加醋酸 300ml 同样提取, 如此重复共提取 2 次, 合并所有滤液与残渣, 匀浆, 过滤,

滤液于 50℃减压除酸并浓缩至约 100ml，喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 47：取河豚鱼皮 50 克，用 1.0mol/L 醋酸 350ml，于 45℃加热提取 24 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加醋酸 300ml 同样提取，如此重复共提取 3 次，合并所有滤液与残渣，匀浆，过滤，滤液于 60℃减压除酸并浓缩至约 100ml，喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 48：取河豚鱼皮 120 克，加 0.5mol/L 醋酸 1000ml，浸泡 48 小时，酸液倾入另一装有 370 克河豚鱼骨（鳍）的容器中，于 95℃加热提取 5 小时后，过滤，收集河豚鱼骨（鳍）的酸提取液，加入上述酸浸泡过的河豚鱼皮中，匀浆，匀浆液于 50℃减压除酸并浓缩至 250ml，浓缩液经离心或过滤后，滤液喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 49：取河豚鱼皮 120 克，加 0.5mol/L 盐酸 1000ml，于 50℃浸泡 12 小时，酸液倾入另一装有 370 克河豚鱼骨（鳍）的容器中，于 50℃浸泡 48 小时后，粉碎匀浆，匀浆液放置 24 小时后，过滤，滤液加入上述酸浸泡过的河豚鱼皮中，匀浆，匀浆液于 50℃减压浓缩除酸，浓缩液经离心或过滤后，滤液喷雾干燥得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 50：取河豚鱼皮 100 克，加 0.5mol/L 丙酸 800ml，于 25℃浸泡 48 小时后，充分匀浆，匀浆液离心或过滤，向离心上清或滤液中加固体氯化钠，使达终浓度为 2.4mol/L，于 10℃以下放置 48 小时以沉淀河豚肽，离心或过滤即得河豚肽沉淀，沉淀用 95%乙醇洗涤去盐脱水后，置不锈钢盘中凉干或于 35℃烘箱中烘干，粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 51：取河豚鱼皮 100 克，加 0.2mol/L 盐酸 800ml，于室温浸泡 48 小时后，充分匀浆，匀浆液离心或过滤，向离心上清或滤液中加固体氯化钠，使达终浓度为 3.5mol/L，于 10℃以下放置 24 小时以沉淀河豚肽，离心或过滤即得河豚肽沉淀，沉淀用 95%乙醇洗涤去盐脱水后，置不锈钢盘中凉干或于 35℃烘箱中烘干，粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 52：取河豚鱼皮 100 克，加 0.2mol/L 丁酸 800ml，室温浸泡 96 小时后，充分匀浆，匀浆液离心或过滤，向离心上清或滤液中缓慢加入无水乙醇，边加边搅拌，使乙醇终浓度为 85%，于 10℃放置 48 小时以沉淀河豚肽，离心或过滤即得河豚肽沉淀，滤液回收乙醇，沉淀置不锈钢盘中凉干或于 35℃烘箱中烘干后，粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 53：取河豚鱼皮 120 克，加 0.005mol/L 氢氧化钠 1000ml，于 60℃加热提取 24 小时，匀浆，过滤，滤液于 70℃减压浓缩至 150ml，冷却后向浓缩液中缓慢加入 12 倍体积的丙酮，边加边搅拌，于 4℃放置 24 小时，过滤即得河豚肽沉淀，滤液回收丙酮，沉淀于 40℃通风烘箱中烘干后即得河豚肽干粉。

实施例 54：取河豚鱼皮 50 克，加 0.01mol/L 硫酸 500ml，25℃浸泡 72 小时，倾去浸泡酸液，用去离子水充分洗去剩余酸液后，加去离子水 300ml，匀浆，匀浆液置于不锈钢盘中，使匀浆液厚度<0.5cm，于 35Pa，-35℃冷冻干燥，得灰白色河豚肽冻干粉。

实施例 55：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1500ml，于 100℃加热提取 10 小时后，过滤，滤液真空浓缩至 500ml。向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克，于 100℃加热提取 8 小时后，匀浆，向匀浆液加醋酸至终浓度为 0.5mol/L，于 60℃密封水解 12 小时，水解液经 8000g 离心后，离心上清真空浓缩至 200ml，喷雾干燥即得河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定，结果表明，该河豚肽胶原含量为 56%。

实施例 56: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 1500ml, 于 120℃, 3 个大气压力下, 加热提取 60 分钟, 过滤, 残渣再加水 1000ml 同样提取, 过滤, 如此反复提取共 5 次, 滤液真空浓缩至 500ml。向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 95℃加热提取 8 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液, 滤液在进风温度 250℃, 出风温度 85℃条件下喷雾干燥即得河豚肽干粉。

实施例 57: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 5000ml, 于 110℃, 2 个大气压力下, 提取 1 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 5000ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 3500ml, 向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 10 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入醋酸至终浓度为 0.05mol/L, 于 60℃密闭水解 72 小时, 水解液经 8000g 离心后, 离心上清真空浓缩至 300ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 58: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加 0.1mol/L 醋酸 5000ml, 于 60℃加热提取 12 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加醋酸 5000ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 3500ml, 向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 6 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液真空浓缩至 300ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 59: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加 1.5mol/L 醋酸 5000ml, 于 45℃加热提取 36 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加醋酸 5000ml 同样提取, 如此共提取 2 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 3500ml, 向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 4 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液真空浓缩至 300ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 60: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加 0.005mol/L 醋酸 5000ml, 于 120℃, 3 个大气压力下, 提取 40 分钟后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加醋酸 5000ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 合并滤液, 真空浓缩至 3500ml, 向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 10 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液真空浓缩至 300ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 61: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加 0.1mol/L 醋酸 5000ml, 于 95℃加热提取 5 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加醋酸 5000ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 3500ml, 向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 50℃加热提取 24 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液真空浓缩至 300ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 62: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加 0.001mol/L 盐酸 5000ml, 于 50℃加热提取 48 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加盐酸 5000ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 3500ml, 向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 95℃加热提取 6 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液真空浓缩至 300ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 63: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加 0.05mol/L 盐酸 5000ml, 于 110℃, 2 个大气压力下, 加热提取 30 分钟后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加盐酸 5000ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 3500ml, 向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 95℃加热提取 6 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液真空浓缩至 300ml, 向浓缩液中加入固体氯化钠, 使达终浓度为 2.4mol/L, 于 10℃以下放置 48 小时以沉淀河豚肽, 离心或过滤即得河豚肽沉淀, 沉淀置不锈钢盘中凉干或于 35℃烘箱中烘干后, 粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 64: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加 0.001mol/L 醋酸 5000ml, 于 50℃加热提取 24 小时

后，过滤，滤液备用，滤渣再加醋酸 5000ml 同样提取，如此共提取 5 次，合并所有滤液，真空浓缩至 3500ml，向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克，于 110℃，2 个大气压力下，提取 1 小时后，匀浆，过滤，滤液真空浓缩至 300ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 65：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加 0.05mol/L 盐酸 5000ml，于 110℃，2 个大气压力下，加热提取 30 分钟后，过滤，滤液备用，滤渣再加盐酸 5000ml 同样提取，如此共提取 3 次，合并所有滤液，真空浓缩至 3500ml，向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克，于 95℃加热提取 6 小时后，匀浆，过滤，滤液真空浓缩至 300ml，冷却后向浓缩液中缓慢加入 8 倍体积的丙酮，边加边搅拌，于 4℃放置 24 小时，过滤即得河豚肽沉淀，滤液回收丙酮，沉淀于 40℃通风烘箱中烘干后即得河豚肽干粉。

实施例 66：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1500ml，于 100℃加热提取 12 小时后，过滤，滤液真空浓缩至 450ml。向滤液中加入河豚鱼皮 150 克，于 110℃，2 个大气压力下，加热提取 1 小时后，匀浆，向匀浆液中加入盐酸至终浓度为 1.5mol/L，于 60℃密封水解 2 小时后，过滤，滤液真空浓缩至 200ml，用 1.0mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 6，在进风温度 200℃，出风温度 93℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 67：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 8000ml，于 100℃加热提取 10 小时后，过滤，滤液浓缩至 2000ml，向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克，于 100℃加热提取 10 小时后，匀浆，向匀浆液中加入浓盐酸至终浓度为 0.001mol/l 后，于 45℃密闭水解 72 小时后，过滤，滤液真空浓缩至 200ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

按 Kivirikko 方法测定，结果表明，该河豚肽胶原含量为 57%。

实施例 68：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 2000ml，于 100℃加热提取 5 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 1500ml 同样提取，如此共提取 5 次，合并所有滤液，真空浓缩至 500ml。向浓缩液中加入河豚鱼皮 200 克，于 100℃加热提取 4 小时后，匀浆，匀浆液经过滤后，滤液真空浓缩至 200ml，喷雾干燥即得河豚肽干粉。

实施例 69：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 1000ml，于 100℃加热提取 10 小时后，过滤，过滤，滤液备用，滤渣再加水 1000ml 同样提取，如此共提取 5 次，合并所有滤液，真空浓缩至 1500ml，向滤液中加入河豚鱼皮 200 克，于 95℃加热提取 5 小时后，匀浆，向匀浆液中加入浓盐酸至终浓度为 0.05mol/L 后，于 50℃密封水解 24 小时后，过滤，滤液真空浓缩至 200ml，在进风温度 195℃，出风温度 100℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 70：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 8000ml，于 100℃加热提取 6 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 5000ml 同样提取，如此共提取 4 次，合并所有滤液，真空浓缩至 1500ml，向滤液中加入醋酸至 0.1mol/L 和河豚皮 200 克，于 80℃加热提取 10 小时后，匀浆，过滤，滤液真空浓缩至 200ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 71：取河豚鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 6000ml，于 100℃加热提取 5 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 5000ml 同样提取，如此共提取 2 次，合并所有滤液，真空浓缩至 1000ml，向滤液中加入醋酸至 0.5mol/L 和河豚鱼皮 200 克，于 40℃浸泡提取 72 小时后，匀浆，过滤，滤液真空浓缩至 200ml，喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 72: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 4000ml, 于 100℃加热提取 6 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 5000ml 同样提取, 如此共提取 3 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 1000ml, 向滤液中加入醋酸至 0.5mol/L 和河豚鱼皮 200 克, 于 40℃浸泡提取 72 小时后, 匀浆, 过滤, 滤液中加固体氯化钠, 使达终浓度为 3.0mol/L, 于 10℃以下放置 48 小时以沉淀河豚肽, 离心或过滤即得河豚肽沉淀, 沉淀用 95%乙醇洗涤去盐脱水后, 置不锈钢盘中凉干或于 35℃烘箱中烘干后, 粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 73: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 2500ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 离心或过滤, 向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 8 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入氢氧化钠至终浓度为 0.05mol/L 后, 于 50℃密封水解 4 小时后, 水解液用稀盐酸调 pH 至 7 以下, 用 10000 Dol. 滤膜进行超滤脱盐, 超滤液真空浓缩至 200ml, 在进风温度 205℃, 出风温度 95℃条件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 74: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 1500ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 离心或过滤, 向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 8 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入碳酸钠至终浓度为 0.1mol/L 后, 于 60℃密封水解 8 小时后, 水解液用稀盐酸调 pH 至 7 以下, 用 10000 Dol. 滤膜进行超滤洗滤脱盐, 超滤液真空浓缩至 200ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 75: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 3500ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 离心或过滤, 向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 8 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入氢氧化钠至终浓度为 0.05mol/L 后, 于 50℃密闭水解 4 小时后, 向水解液中加入固体氯化钠至终浓度为 2.4mol/L, 于 10℃放置 48 小时沉淀河豚肽, 离心得河豚肽沉淀, 沉淀置不锈钢盘中凉干或于 35℃烘箱中烘干后, 粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 76: 取河豚鱼骨 500 (鳍) 克, 加去离子水 1500ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 过滤, 向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 8 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入胰蛋白酶至 10mg/L 终浓度和盐酸至终浓度为 0.05mol/L 后, 于 50℃密闭水解 48 小时后, 过滤, 滤液真空浓缩至 200ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 77: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 1500ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 过滤, 向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 8 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入胃蛋白酶至 10mg/L 终浓度和浓盐酸至终浓度为 0.05mol/L 后, 于 35℃密封水解 16 小时后, 过滤, 滤液于 70℃真空浓缩至 200ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 78: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 1500ml, 于 100℃提取 10 小时后, 过滤, 向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃提取 8 小时后, 匀浆, 匀浆液浓缩至 300ml 后, 浓缩液调 pH 至 7.4 后, 加胶原酶□至 1mg/L 和氯化钠至 0.2mol/L 终浓度, 于 37℃密闭水解 10 小时后, 过滤, 滤液真空浓缩至 200ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 79: 取河豚鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 1500ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 过滤, 向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 100℃加热提取 8 小时后, 匀浆, 匀浆液浓缩至 300ml 后, 浓缩液调 pH 至 7.4 后加胶原酶□至 10mg/L 和氯化钠至 0.2mol/L 终浓度, 于 37℃密闭水解 6 小时后, 用 10000 Dol. 滤膜进行超滤脱盐, 超滤液真空浓缩至 200ml, 在进风温度 280℃, 出风温度 100℃条

件下喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 80: 取河豚鱼骨(鲐) 500 克, 加去离子水 1500ml, 于 110℃, 2 个大气压力下, 加热提取 5 小时后, 过滤, 残渣弃去, 滤液真空浓缩至 500ml。向滤液中加入河豚鱼皮 200 克, 于 110℃, 2 个大气压力下, 加热提取 4 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 500ml, 于 110℃, 2 个大气压力下, 加热提取, 合并滤液与残渣, 匀浆, 匀浆液经过滤后, 滤液真空浓缩至 200ml, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 81: 取天然河豚鱼皮(有毒) 500 克, 加 0.1mol/L 硫酸 3000ml, 40℃浸泡 24 小时, 倾去酸液后, 水洗, 再加硫酸同样浸泡处理 5 次, 共 6 次, 用水充分洗去剩余酸液后, 加去离子水 3000ml, 匀浆, 过滤, 滤液减压浓缩后, 喷雾干燥, 得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 82: 取天然河豚鱼皮(有毒) 500 克, 加 0.1mol/L 盐酸 1500ml, 85℃处理 1 小时, 倾去浸泡酸液, 水洗, 再加盐酸同样浸泡处理 4 次, 共 5 次, 用水充分洗去剩余酸液后, 加去离子水 3000ml, 匀浆, 过滤, 滤液置于不锈钢盘中, 使溶液厚度<0.5cm, 于 10Pa, -5℃冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉。

实施例 83: 取天然河豚鱼皮(有毒) 500 克, 加 0.1mol/L 氢氧化钠 5000ml, 浸泡 96 小时, 倾去浸泡碱液, 再加氢氧化钠同样浸泡处理, 共 3 次, 用蒸馏水充分洗去剩余碱液后, 加去离子水 3000ml, 匀浆, 匀浆液过滤后于 30Pa, -25℃冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉。

实施例 84: 天然有毒河豚鱼皮 500 克, 加 0.1mol/L 氢氧化钠 2000ml, 浸泡 24 小时, 倾去浸泡碱液, 再加氢氧化钠同样浸泡处理 3 次, 共 4 次, 用蒸馏水充分洗去剩余碱液后, 加 0.5mol/L 醋酸 5000ml, 浸泡 48 小时后, 匀浆, 向匀浆液中加入氯化钠至终浓度为 3.0 mol/l 后, 于 10℃以下放置沉淀 36 小时, 离心取沉淀, 沉淀复溶于 0.2 mol/L 醋酸中, 并加氯化钠至 1.4mol/L, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀和上清。沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚Ⅱ型胶原。离心上清补加氯化钠至 3.0mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 36 小时, 离心取沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 20Pa, -8℃冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚肽Ⅱ型胶原。

实施例 85: 天然有毒河豚鱼皮 250 克, 加 1.5mol/L 碳酸钠 5000ml, 浸泡 48 小时, 倾去浸泡碱液, 再加碳酸钠同样浸泡处理 3 次, 共 4 次, 用蒸馏水充分洗去碱液后, 加 0.2 mol/L 盐酸 1500ml, 浸泡 8 小时, 滤取浸泡酸液备用, 用去离子水洗涤并刮去鱼皮表面色素层后, 重新加入上述浸泡酸液, 浸泡 24 小时后, 用去离子水洗涤, 匀浆, 匀浆液中加入氯化钠至终浓度为 2.4 mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀, 沉淀复溶于 0.1 mol/L 盐酸中, 并加氯化钠至 1.4 mol/L, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀和上清。沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚Ⅲ型胶原。离心上清补加氯化钠至 3.5 mol/L 后, 于 10℃以下放置沉淀 48 小时, 离心取沉淀, 沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后, 置不锈钢盘中, 使厚度<0.5cm, 于 25Pa, -15℃冷冻干燥, 得白色河豚肽冻干粉, 此沉淀主要含河豚肽Ⅰ型胶原。

实施例 86: 取天然有毒河豚鱼皮 150 克、鱼骨(鲐)500 克混合物, 加 0.1mol/L 氢氧化钾 5000ml, 浸泡 24 小时, 倾去浸泡碱液, 再加氢氧化钾同样浸泡处理 3 次, 共 4 次, 用蒸馏水充分洗去剩余

碱液后,加去离子水 2000ml,于 95℃加热提取 10 小时后,过滤,滤液备用,滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后,将提取液连同提取残渣匀浆,匀浆液经离心过滤后,所有滤液合并,80℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加盐酸至 pH2 和胰蛋白酶至 10mg/L,于 54℃密闭水解 96 小时后,喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 87: 取天然有毒河豚鱼骨(鲠)500 克,河豚鱼皮 200 克,加 1mol/L 碳酸钠 5000ml,浸泡 24 小时,倾去浸泡碱液,再加碳酸钠同样浸泡处理 3 次,共 4 次,用蒸馏水充分洗去剩余碱液后,加去离子水 2500ml,于 120℃,3 个大气压力下,加热提取 1 小时后,过滤,滤液备用,滤渣再加水 2500ml 同样提取,如此重复共提取 3 次,最后用滤液将残渣匀浆,匀浆液经过滤后,真空浓缩至 350ml,向浓缩液中加盐酸至终浓度为 0.001mol/L,于 95℃密闭水解 8 小时后,冷却后,向水解液中加入氯化钠至终浓度为 4.0mol/L 后,于 10℃以下放置沉淀 36 小时,离心取白色沉淀,沉淀经 95%乙醇洗涤脱水去盐后,置不锈钢盘中,使厚度<0.5cm,于 55℃通风烘干或冷冻干燥,得淡黄色或白色河豚肽干粉。

实施例 88: 取天然有毒河豚鱼骨(鲠)500 克,河豚鱼皮 200 克,加 0.2mol/L 氢氧化钠 5000ml,浸泡 24 小时,倾去浸泡碱液,再加氢氧化钠同样浸泡处理 3 次,共 4 次,用蒸馏水充分洗去剩余碱液后,加去离子水 2500ml,于 110℃,2 个大气压力下,加热提取 1 小时后,过滤,滤液备用,滤渣再加水 2500ml 同样提取,如此重复共提取 4 次,最后用滤液将残渣匀浆,匀浆液经过滤后,真空浓缩至 350ml,向浓缩液中加盐酸至终浓度为 0.5mol/L,于 65℃密闭水解 6 小时后,冷却后,加入无水乙醇,边加边搅拌,使乙醇终浓度为 85%,于 10℃以下放置 48 小时以沉淀河豚肽,离心或过滤即得河豚肽沉淀,沉淀置不锈钢盘中凉干或于 55℃通风烘箱中烘干后,粉碎即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 89: 取天然有毒河豚鱼皮 150 克、鱼骨(鲠)500 克混合物,加 0.5mol/L 碳酸钠 5000ml,于 95℃加热处理 0.5 小时,倾去浸泡碱液,再加碳酸钠碱液同样处理 3 次,共 4 次,用蒸馏水充分洗去剩余碱液后,加去离子水 2000ml,于 95℃加热提取 10 小时后,过滤,滤液备用,滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后,将提取液连同提取残渣匀浆,匀浆液经离心过滤后,所有滤液合并,80℃真空浓缩至 250ml。向浓缩液中加盐酸至终浓度为 1.0mol/L,于 60℃密闭水解 5 小时后,加氢氧化钠中和至 pH6.5,喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 90: 取天然有毒河豚鱼皮 150 克、鱼骨(鲠)500 克混合物,加 0.2mol/L 氢氧化钠 5000ml,于 65℃加热处理 2 小时,倾去浸泡碱液,再加氢氧化钠同样浸泡处理 3 次,共 4 次,用蒸馏水充分洗去剩余碱液后,加去离子水 2000ml,于 95℃加热提取 10 小时后,过滤,滤液备用,滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后,将提取液连同提取残渣匀浆,匀浆液经离心过滤后,所有滤液合并,80℃真空浓缩至 250ml。喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 91: 取天然有毒河豚鱼皮 150 克、鱼骨(鲠)500 克混合物,加 0.1mol/L 氢氧化钠 5000ml,于 75℃加热处理 1 小时,倾去浸泡碱液,再加氢氧化钠同样浸泡处理 3 次,共 4 次,用蒸馏水充分洗去剩余碱液后,加去离子水 2000ml,于 95℃加热提取 10 小时后,过滤,滤液备用,滤渣再加去离子水 1000ml 同样提取 10 小时后,将提取液连同提取残渣匀浆,匀浆液经离心过滤后,所有滤液合并,80℃真空浓缩至 250ml。将浓缩液调 pH 至 6.0 并加木瓜蛋白酶至 200mg/L,于 35℃密

闭水解 96 小时后, 喷雾干燥即得淡黄色河豚肽干粉。

实施例 92: 河豚肽对大鼠十二指肠溃疡的影响

雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 250—300g, 南京医科大学实验动物中心提供。试验按 KOJI T., et.al. *Gastroenterology*, 90:636-645, 1986. 方法进行。

结果表明, 河豚肽对组胺和吲哚美辛诱发的大鼠十二指肠溃疡有极显著预防作用。

实施例 93: 河豚肽对无水乙醇致大鼠胃粘膜损伤的保护作用

SD 大鼠 60 只, 体重 180-200g, 雌雄各半, 南京医科大学实验动物中心提供。试验按卫生部《新药临床前研究指导原则汇编》和《中药新药临床前研究指南》方法进行。结果见表 1。

结果表明, 河豚肽剂量依赖性对无水乙醇诱发的大鼠胃粘膜损伤有极显著保护作用。

表 1. 河豚肽对无水乙醇致大鼠胃粘膜损伤的保护作用($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	途径	溃疡指数	<i>p</i> vs 病理组
正常对照组	NS	10	ig	7.0±5.2	<0.001
病理模型组	NS	10	ig	120.9±22.6	
枸橼酸铋钾	100mg/kg	10	ig	15.0±6.0	<0.001
河豚肽	高剂量	10	ig	0.0±0.0	<0.001
	中剂量	10	ig	4.6±4.5	<0.001
	低剂量	10	ig	15.0±4.2	<0.001

实施例 94: 河豚肽对幽门结扎大鼠 (Shay 模型) 胃溃疡的作用

SD 大鼠 50 只, 体重 180—200g, 雌雄各半, 南京医科大学实验动物中心提供。试验按卫生部《新药临床前研究指导原则汇编》和《中药新药临床前研究指南》方法进行。结果见表 2。

结果表明, 河豚肽呈剂量依赖性对 Shay 大鼠胃溃疡有极显著预防作用。说明河豚肽对胃酸性胃溃疡有显著性预防治疗作用。

表 2. 河豚肽对 Shay 大鼠胃溃疡的预防作用($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	途径	溃疡指数	<i>p</i> vs 病理组
病理模型组	NS	10	ig	20.3±1.1	
西米替丁	80mg/kg	10	ip	15.8±1.5	<0.05
河豚肽	高剂量	10	ig	1.7±1.1	<0.001
	中剂量	10	ig	2.7±2.5	<0.001
	低剂量	10	ig	3.6±2.7	<0.001

实施例 95: 河豚肽对醋酸灼烧型胃溃疡的作用

SD 大鼠 50 只, 体重 180—200g, 雌雄各半, 南京医科大学实验动物中心提供。试验按卫生部《新药临床前研究指导原则汇编》和《中药新药临床前研究指南》方法进行。结果见表 3。

结果表明, 河豚肽呈剂量依赖性对醋酸灼伤型胃溃疡有极显著治疗作用。说明河豚肽对慢性

胃溃疡有治疗作用，可显著促进溃疡部位的愈合。

表 3. 河豚肽对乙酸灼烧型胃溃疡的治疗作用($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	途径	溃疡面积(m ²)	p vs 病理组
病理组	NS	10	ig	70.1±34.4	组别
西米替丁	80mg/kg	10	ip	44.7±38.4	<0.001
河豚肽	高剂量	10	ig	12.6±10.6	<0.001
	中剂量	10	ig	17.9±12.2	<0.001
	低剂量	10	ig	15.0±10.1	<0.001

实施例 96: 河豚肽对消炎痛诱发的大鼠胃溃疡的预防作用

SD 大鼠 50 只，体重 180~200g，雌雄各半，南京医科大学实验动物中心提供。试验按《药理学实验指南—新药发现和药理学评价》(杜冠华译，科学出版社)方法进行。结果见表 4。

结果表明，河豚肽呈剂量依赖性对消炎痛诱发的大鼠胃溃疡有极显著预防治疗作用。说明河豚肽对非甾体抗炎药引起的胃粘膜损伤溃疡有显著预防治疗作用。河豚肽对胃粘膜损伤的保护作用可能是通过升高胃粘膜 PGE₂ 含量实现的。

表 4. 河豚肽对消炎痛诱发的大鼠胃溃疡的作用($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	途径	溃疡个数	p vs 病理组
病理组	NS	10	ig	21.1±2.5	
法莫替丁	5mg/kg	10	ip	5.8±2.5	<0.001
河豚肽	高剂量	10	ig	3.6±2.3	<0.001
	中剂量	10	ig	7.5±3.5	<0.001
	低剂量	10	ig	9.6±1.9	<0.001

实施例 97: 河豚肽对大鼠乙醇急性肝损伤的保护作用

SD 大鼠 50 只，体重 180-200g，雌雄各半。试验按《新药临床前研究指导原则汇编》方法进行。用自动生化分析仪测定血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶 (ALT 和 AST) 活力。结果见表 5。

结果表明，河豚肽呈剂量依赖性对大鼠无水乙醇急性肝损伤有极显著保护作用。

表 5. 河豚肽对大鼠乙醇急性肝损伤的保护作用($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	途径	谷丙转氨酶 (U)	谷草转氨酶 (U)
正常组	NS	10	ig	41.0±3.1***	156.7±8.1***
病理组	NS	10	ig	59.5±5.2	221.3±15.6
河豚肽	高剂量	10	ig	39.0±1.4***	162.0±4.2***
	中剂量	10	ig	38.7±6.3***	156.3±5.7***
	低剂量	10	ig	49.7±15.0**	186.0±20.9**

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ VS 病理组

实施例 98: 河豚肽对环磷酰胺诱发的小鼠白细胞数下降的影响

昆明种小鼠 75 只, 雌雄各半, 体重为 18-22g, 东南大学附属医学院实验动物中心提供。试验按卫生部《新药临床前研究指导原则汇编》方法进行。结果见表 6。

结果表明, 河豚肽呈剂量依赖性升高环磷酰胺诱发的小鼠血液白细胞数下降。说明河豚肽可增强机体免疫能力, 降低化疗药物的副作用。

表 6. 河豚肽对环磷酰胺诱发降低的小鼠血液白细胞数(WBC)的影响($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	途径	WBC ($\times 10^9/L$)
正常对照组	NS	15	ig	$5.3 \pm 1.1^{**}$
病理模型组	100mg 环磷酰胺/kg	15	ig	3.3 ± 1.7
河豚肽	高剂量	15	ig	$6.3 \pm 2.0^{**}$
	中剂量	15	ig	4.2 ± 1.9
	低剂量	15	ig	$3.6 \pm 1.4^{###}$

** $P < 0.01$, VS 病理组 $^{###}P < 0.01$, VS 对照组

实施例 99: 河豚肽对大鼠酒精性脂肪肝的影响

SD 大鼠 40 只, 体重 150g~200g, 雄性。试验按《药理学实验指南—新药发现和药理学评价》(杜冠华译, 科学出版社)及相关文献进行。结果见表 7。

结果表明, 河豚肽呈剂量依赖性抑制酒精性脂肪肝大鼠肝脏和胃壁层胶原蛋白含量的病理性升高。表明河豚肽可抑制胶原蛋白在肝脏和胃中的病理性合成。

表 7. 河豚肽对大鼠酒精性脂肪肝的影响($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	肝胶原蛋白含量 (%)	胃胶原蛋白含量 (%)
正常组	NS	10	$0.14 \pm 0.04\%$	$1.29 \pm 0.4\%$
病理组	NS	10	$0.25 \pm 0.09\%^{**}$	$2.00 \pm 0.63\%^{*}$
河豚肽	高剂量	10	$0.20 \pm 0.06\%^{*}$	$1.40 \pm 0.48\%^{*}$
	低剂量	10	$0.19 \pm 0.08\%$	$1.68 \pm 0.38\%$

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ VS 对照组

实施例 100: 河豚肽在大鼠体内的时间药效学试验

SD 大鼠 50 只, 雌雄各半。试验按卫生部《新药临床前研究指导原则汇编》方法进行。

结果表明, 河豚肽在给药后 30 分钟即达最大药效的 96.81%, 说明河豚肽起效迅速。而且河豚肽在给药后 18 小时仍保持最大药效的 77.78%, 说明河豚肽具有长效性。

实施例 101: 河豚肽对胃排空的影响

昆明种小鼠 105 只, 体重 20—25g, 雌雄各半。试验按卫生部《中药新药临床前研究指南》方法和 Shi G., et. al. *Gut*, 41:612-618, 1997. 酚红法进行。结果见表 8。

结果表明, 河豚肽呈剂量依赖性对小鼠胃排空和溴吡斯地明促进胃排空作用有极显著抑制作用。说明河豚肽可阻断乙酰胆碱的作用, 抑制乙酰胆碱对胃平滑肌的收缩刺激。延长食物在胃肠道中的滞留时间, 促进食物的消化吸收。

表 8. 河豚肽对小鼠胃排空的抑制作用($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	胃中酚红残留量 (mg)	胃排空率 (%)
标准组		15	7.61 \pm 2.78	
正常对照组	NS	15	1.28 \pm 0.75	86.0 \pm 7.9 [#]
溴吡斯地明组	0.1mg/kg	15	0.47 \pm 0.36	93.8 \pm 4.8 [*]
河豚肽高剂量+	高剂量	15	1.66 \pm 0.17	84.0 \pm 11.7 ^{***#}
溴吡斯地明	+0.1mg/kg			
河豚肽	高剂量	15	1.86 \pm 0.1	75.0 \pm 13.3 ^{***#}
	中剂量	15	1.70 \pm 0.16	77.2 \pm 10.1 ^{***#}
	低剂量	15	1.24 \pm 0.58	83.2 \pm 23.2 [*]

*** $P < 0.001$, * $P < 0.01$ VS 溴吡斯地明组 # $P < 0.05$ VS 正常对照组

实施例 102: 河豚肽对吡哌美辛胃溃疡大鼠胃粘膜中 PGE_2 含量的影响

SD 大鼠 60 只, 体重 180-200g, 雌雄各半。试验按《药理学实验指南—新药发现和药理学评价》(杜冠华译, 科学出版社) 及相关文献方法进行。结果见表 9

结果表明, 河豚肽呈剂量依赖性对 PGE_2 含量有显著升高作用。揭示河豚肽保护、维持胃粘膜 PGE_2 水平和胃粘膜血流量, 是其抗溃疡作用和粘膜细胞保护机制之一。

表 9. 河豚肽对吡哌美辛胃溃疡大鼠胃粘膜中 PGE_2 含量的影响($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量	动物数	PGE_2 (pg/mg 蛋白)
正常对照组	NS	10	176 \pm 79 ^{**}
病理模型组	NS	10	79 \pm 16
枸橼酸铋钾组	100mg/kg	10	170 \pm 104 [*]
河豚肽	高剂量	10	198 \pm 141 [*]
	中剂量	10	140 \pm 63 [*]
	低剂量	10	138 \pm 91

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ VS 病理模型组

实施例 103: 河豚肽对乙醇性胃溃疡大鼠胃粘膜一氧化氮含量、iNOS 活力以及 iNOS 和 cNOS 基因表达水平的影响

试验按卫生部《中药新药临床前研究指南》方法进行大鼠乙醇性胃溃疡试验, 观察河豚肽对大鼠胃粘膜一氧化氮含量、iNOS 活力以及 iNOS 和 cNOS 基因表达水平的影响。一氧化氮含量和 NOS 活力采用文献方法测定(陈丁丁等: 联苯胺荧光分光光度法测定一氧化氮合酶活力. 中国药科大学学报, 2:134~137, 2002); NOSs mRNA 用 Trizol 试剂盒提取后采用 RT-PCR 进行扩增, 凝胶电泳后, EB 染色, 自动光密度扫描仪检测记录 NOSs 和 β -actin cDNA 电泳条带光密

度强度, 以此作为相应基因表达量。iNOS 和 cNOS 基因表达水平分别用 iNOS/ β -actin 和 cNOS/ β -actin 光密度比值表示。cNOS、iNOS 和 β -actin 引物序列设计按参考文献设计 (Markewitz, B.A., et al. *J Clin. Invest.* 91:2138-2143, 1993)。

结果表明, 一方面, 河豚肽呈剂量依赖性极显著降低乙醇损伤大鼠胃粘膜中一氧化氮水平、iNOS 活力以及 iNOS 基因表达水平, 并使一氧化氮含量和 iNOS 活力极显著降低至正常水平以下。同时另一方面, 河豚肽极显著升高乙醇诱发的 cNOS 基因表达水平下降, 并恢复至正常水平。表明河豚肽对胃粘膜一氧化氮水平、iNOS 活力、iNOS 和 cNOS 基因表达的差别调节, 是其胃粘膜保护、预防和治疗胃溃疡的重要机制之一。

实施例 104: 河豚肽抗鸡胚血管生成 (CAM) 试验

鸡胚胎的正常发育包括位于卵黄膜内外部血管系统形成, 卵黄膜由卵黄 (蛋黄) 运送营养物质以发育胚胎。当河豚肽施于卵黄膜上时, 其抗血管生成活性物质可以抑制在卵黄膜内发生的血管形成。

将含有不同量的河豚肽及对照药物的甲基纤维素圆盘 (惰性固体和透明基质) 置于卵黄膜血管周边的外缘上, 在此发生血管生成过程。阳性对照是含有 1.5mg/ml 2-甲氧基雌二醇的甲基纤维素圆盘。将对照和河豚肽圆盘置于 3 天龄胚胎的卵黄膜上。在此点, 只有主血管开始生长至卵黄。同时将含有阴性对照或一定量河豚肽的甲基纤维素圆盘始终置于同一胚胎的卵黄膜上。两个圆盘以相对于胚胎头尾轴对称的方式放置, 以便在对比评价河豚肽和阴性对照的能效时减少个体之间的差异。在圆盘放置后 24 小时评估血管形成, 结果表示为其中血管形成受到影响的胚胎的百分比。当河豚肽圆盘与阴性对照 (此时已有较多细小血管生成) 对比, 其血管生长途径出现偏离或减弱或当在圆盘下观察不到血管生长时可以认为血管形成受到抑制。结果表明, 河豚肽可显著抑制鸡胚新生血管的发生。

实施例 105: 淡水人工繁殖饲养河豚的河鲀毒素毒性的测定

在淡水人工繁育的暗纹东方鲀和菊黄东方鲀不同生长阶段取 50g~1250g 体重河豚 (相当于 6 月至两年龄的鱼), 解剖分取卵巢、精囊、肝脏、皮肤、血液、骨、肉、心脏、眼球和其余内脏, 剪碎, 按 1:3 (w/v) 加 0.2mol/L 醋酸匀浆, 匀浆液于室温放置 6 小时并不时搅动, 用 1 mol/L 碳酸钠调 pH6~7 后, 给小鼠灌胃 0.8ml/20g/次, 每 8 小时一次, 共 3 次 (相当于 60kg 体重的人 24 小时内摄入 2.4kg 量), 每种组织匀浆液灌胃 5 只小鼠。结果: 所有小鼠均存活, 无一例死亡。证实淡水人工繁育河豚在各个生长阶段无毒。

实施例 106: 急性毒性试验

试验按国家食品药品监督管理局《中药新药研究技术要求》方法进行。预试验结果表明, 河豚肽在最大浓度时, 测不出急性毒性参数 LD_{50} 。

实验结果: 给药后连续观察 7 天, 未见动物死亡。结果表明, 河豚肽高度安全。

实施例 107: 河豚肽长期毒性试验

试验按国家食品药品监督管理局《中药新药研究技术要求》方法, 进行河豚肽 Beagle 犬长期毒性试验。结果显示河豚肽高、中剂量对三个月长期毒性试验犬体重有显著增加作用。河豚肽高、中、低剂量对试验犬生化、血常规指标无显著影响。河豚肽可升高实验动物胸腺指数,

试验犬其余脏器系数均显示正常。

结果表明，河豚肽可长期服用，安全有效。大剂量服用可增加机体体重，增加机体免疫器官重量，提高机体免疫力。

实施例 108: 河豚肽单向免疫扩散定性定量测定

试验按常规单向免疫扩散方法进行。河豚肽浓度与其沉淀环直径成正相关。以沉淀环直径对标准品浓度回归求得标准曲线，可对未知样品进行定性定量测定。结果见附图 1。图中的白色圆环为河豚肽与其兔抗血清扩散形成的专一免疫沉淀环。用对照品如各种非河豚鱼皮，鱼鳔，鱼骨，明胶，阿胶，猪皮等的胶原蛋白或变性胶原蛋白进行本试验，则无免疫沉淀环形成，表明本鉴别试验具有专属性。

实施例 109: 河豚肽的对流免疫电泳鉴别试验

按常规对流免疫电泳方法进行。观察河豚肽供试品出现的免疫沉淀线。结果见附图 2。图中下半区的白色条带为河豚肽与其兔抗血清电泳后形成的专一免疫沉淀线，上半区为对照品的胶原蛋白或变性胶原蛋白电泳区，可见无免疫沉淀线形成，对照品来自各种非河豚鱼皮，鱼鳔，鱼骨，明胶，阿胶，猪皮等。表明本鉴别试验具有专属性。

实施例 110: 河豚肽蛋白含量测定

按中华人民共和国药典（2000 版）附录克氏定氮法和 Lowry 法进行河豚肽总蛋白含量测定，各进行 6 批次测定，结果表明，河豚肽总蛋白含量均大于 70%。

实施例 111: 河豚肽片剂的制备工艺

将粉状的河豚肽原料药与微晶纤维素和淀粉以重量比为 1: (0.8—1): (0.25—0.7) 混合均匀，过 60—80 目筛，加入适量乙醇，将混合物制成软材，过 22 目筛，得到制片颗粒，在 50℃—60℃ 的条件下通风干燥，再过 20 目筛，得到制片颗粒，加入占片颗粒重量 3%—4% 的干淀粉和 1%—2% 的滑石粉，混合均匀，在压片机上压成片剂即得河豚肽片剂。

实施例 112: 河豚肽胶囊和肠溶胶囊的制备工艺

将粉状的河豚肽原药与淀粉和羟丙纤维素以重量比为 1: (0.4—0.8): (0.05—0.16) 混合均匀，加 10% 淀粉浆适量，制成均匀软材，20 目尼龙筛制粒，加入 0.016—0.032 倍河豚肽干粉重量的硬脂酸镁，混匀，装入 3 号胶囊或肠溶胶囊即得。

实施例 113: 河豚肽咀嚼片制备工艺

将粉状的原料与氢氧化镁、甘露醇和糖粉以重量比为 1: (0.24—0.27): (0.5—0.7): (0.2—0.4) 混合均匀，加入 5% 的聚乙二醇—6000（溶于 50% 乙醇）液混合制软材，过 14 目筛，于 55—66℃ 干燥，干粒过 16 目筛，用 0.01—0.02 倍河豚肽干粉重量的硬脂酸镁与香料和阿斯巴甜混合，然后加到干粒中，混合 10 分钟，用 1/2 寸平冲压片。

实施例 114: 河豚肽口服液制备工艺

取河豚鱼骨（鳍）500 克，河豚鱼皮 200 克，加蒸馏水 2000ml，于 100℃ 加热提取 10 小时后，收集提取液，残渣再用 2000ml 蒸馏水同样提取后，粉碎匀浆，离心或过滤后，滤液与第一次提取液合并，合并液真空浓缩至比重为 1.00—1.10，加入尼泊金乙酯，阿斯巴甜，添加蒸馏水至全量，混匀，过滤，灌封于 10ml 口服液瓶中，灭菌即得。

实施例 115: 河豚肽滴丸的制备工艺

取河豚鱼骨(鲚) 500 克, 河豚鱼皮 200 克, 加蒸馏水 2000ml, 于 100℃加热提取 10 小时后, 收集提取液, 残渣再用 2000ml 蒸馏水同样提取后, 粉碎匀浆, 离心或过滤后, 滤液与第一次提取液合并, 合并液真空浓缩至比重为 1.01—1.10, 加入适量的聚乙二醇—6000 和尼泊金乙酯, 加热至 90~100℃, 充分搅拌, 转移至储液瓶中, 密闭并保温在 80~90℃, 调节液滴定量阀门, 由上往下, 滴入 10~15℃的液状石蜡中, 将成形的滴丸沥尽并擦除液体石蜡, 干燥, 即得。

实施例 116: 河豚肽胶剂的制备工艺

取河豚鱼皮切成小块, 与河豚鱼骨浸泡洗净, 分次水煎, 滤过, 合并滤液, 用文火浓缩(或加适量黄酒、冰糖、豆油)至稠膏状, 冷凝, 切片, 阴干。

实施例 117: 河豚肽含片的制备工艺

以河豚肽干粉为囊心物, 聚乙二醇—6000 为囊材制成微囊, 加入适当赋型剂, 直接压制成口含片。口含片的处方如下: 河豚肽干粉: 45%, 活性炭: 3%, 硬脂酸镁: 1%, 糊精: 1%, 聚乙二醇—6000: 50%。在上述工艺中, 聚乙二醇—6000 在干燥状态下直接压片, 能达到保持囊膜药稳定性好、易溶、速效的目的, 而且对中药异味有良好的屏蔽作用。有利于含片消化、释放, 发挥药效; 河豚肽微囊有较强吸湿性和粘性, 压片困难, 活性炭为抗粘剂效果最好。

实施例 118: 河豚肽肠溶片的制备工艺

肠溶□、□号树脂包衣液基本包衣处方: 95%乙醇 28kg, 去离子水适量, 聚丙烯酸树脂□适量, 聚丙烯酸树脂□适量, 蓖麻油 0.65L, 苯二甲酸二乙酯 0.3L, 滑石粉适量。

包衣条件: By-1000 糖衣机, 转速 31~32r/min, 喷枪与片子间的距离应调节在 30~35cm 之间, 片心硬度 4kg 以上, 片温 30℃左右, 风温℃, 空气压力 0.4~0.5mPa。

河豚肽肠溶片剂的制备: 将粉状的原药与微晶纤维素和淀粉以重量比为 1: (0.8—1): (0.25—0.7) 混合均匀, 过 60—80 目筛, 加入适量乙醇, 将混合物制成软材, 过 22 目筛, 得到制片颗粒, 在 50℃—60℃的条件下通风干燥, 再过 20 目筛, 得到制片颗粒, 加入占片颗粒重量 3%—4%的干淀粉和 1%—2%的滑石粉, 混合均匀, 在压片机上压成片剂即得河豚肽片剂。包肠溶衣, 分装, 即得。

实施例 119: 河豚肽糖衣片的制备工艺

将粉状的原药与微晶纤维素和淀粉以重量比为 1: (0.8—1): (0.25—0.7) 混合均匀, 过 60—80 目筛, 加入适量乙醇, 将混合物制成软材, 过 22 目筛, 得到制片颗粒, 在 50℃—60℃的条件下通风干燥, 再过 20 目筛, 得到制片颗粒, 加入占片颗粒重量 3%—4%的干淀粉和 1%—2%的滑石粉, 混合均匀, 在压片机上压成片剂即得河豚肽片剂。

包衣工序: 在第一次加足糖浆量(或胶液), 稍转动糖衣锅应及时撒入滑石粉, 防止粘连发生。在挂隔离层时, 要特别注意片心吸水量过多应适当延长干燥时间, 同时也要注意滚动多会磨坏片边角等情况, 包衣 1~2 层粉衣时需延长干燥时间, 以防止片心水分未除尽, 造成储存期间片剂膨胀出现裂片现象。总的要求是薄层多次, 层层干燥的原则。

实施例 120: 河豚肽泡腾片的制备工艺

本工艺采用微型胶囊制备方法的喷雾吸收干燥法，煎碳酸氢钠的聚乙二醇-6000 溶液经喷雾器喷雾于盛装河豚肽干粉的包衣锅内，最后过筛，制成河豚肽颗粒。将枸橼酸、阿斯巴甜过筛，与河豚肽颗粒及富马酸细粉一起混匀，压片，压片时 填料处用红外灯照射。其工艺特点在于：聚乙二醇-6000 通过微囊包裹的方法将碳酸氢钠包裹起来；富马酸既起发泡剂又起水溶性润滑剂作用；压片时填料口用红外灯照射，控制颗粒的适宜温度，增加颗粒的软润性，进一步保证压片不粘冲。

实施例 121: 河豚肽冲剂的制备工艺

取河豚鱼骨（鳍）500 克，河豚鱼皮 200 克，加蒸馏水 2000ml，于 100℃加热提取 10 小时后，收集提取液，残渣再用 2000ml 蒸馏水同样提取后，粉碎匀浆，离心或过滤后，滤液与第一次提取液合并，合并液真空浓缩至比重为 1.10—1.30，加入糖粉、糊精，制成软材，制颗粒，干燥，分装，即得。

实施例 122: 河豚肽冻干粉的制备工艺

取河豚鱼皮 50 克，加 0.1mol/L 醋酸 500ml，浸泡 48 小时，倾去浸泡酸液，用蒸馏水充分洗去剩余酸液后，加蒸馏水 300ml，匀浆，匀浆液置于不锈钢盘中，使匀浆液厚度<0.5cm，于 35Pa，升华温度为-30℃冷冻干燥，得河豚肽冻干粉。分装，即得。

实施例 123: 河豚肽糖浆剂的制备工艺

取河豚鱼骨（鳍）500 克，河豚鱼皮 200 克，加蒸馏水 2000ml，于 100℃加热提取 10 小时后，收集提取液，残渣再用 2000ml 蒸馏水同样提取后，粉碎匀浆，离心或过滤后，滤液与第一次提取液合并，合并液真空浓缩至比重为 1.10—1.30；另取蔗糖，制成糖浆加入浓缩液中，搅匀，分装，即得。

实施例 124: 河豚肽微囊的制备工艺

河豚肽干粉，用明胶和阿拉伯胶作复合囊材，将河豚肽混悬于阿拉伯胶的水溶液中，在 38℃恒温下搅拌混匀（pH=3），再将等温的明胶溶液缓缓加入，搅拌（pH=3.24），两种亲水胶体材料互相交联形成复合物后，溶解度降低凝聚形成微囊。继续搅拌 10 分钟，加 37℃蒸馏水稀释，等混悬液温度降至 10℃以下时，用甲醛（36%）固化 35 分钟，离心洗涤至无甲醛反应，冷冻干燥得河豚肽微囊，再制成微囊使用。

实施例 125: 河豚肽控释胶囊的制备工艺

将砂糖过筛，选出一定大小的细料，置糖衣锅（或一步制粒机，离心流化制粒机）中，并翻动，以糖浆为粘合剂，撒入河豚肽干粉，制成含药量 40%~50%的小丸，将称重的小丸用膜材料包衣，控制膜重，得到包衣小丸，装入胶囊中。

实施例 126: 河豚肽膏剂的制备工艺

取河豚鱼骨（鳍）500 克，河豚鱼皮 200 克，加蒸馏水 2000ml，于 100℃加热提取 10 小时后，收集提取液，残渣再用 2000ml 蒸馏水同样提取后，粉碎匀浆，离心或过滤后，滤液与第一次提取液合并，合并液真空浓缩至稠膏状，加炼蜜适量，搅匀，继续浓缩成膏状，即得。

以上是对本发明的描述，应当理解，在不偏离本发明指导的前提下，本领域专业人员有足



00-00-00

够的能力和知识通过用等同物或类似法代替本发明的某些内容来进行修改并达到同样的目的。
因此这些显而易见的改变也被本申请所覆盖。

说明书附图

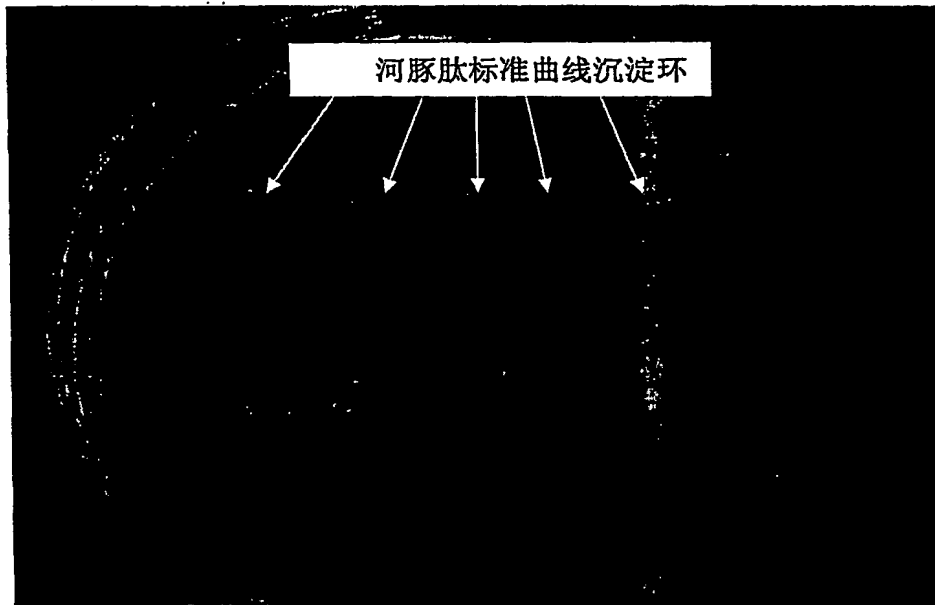


图 1.

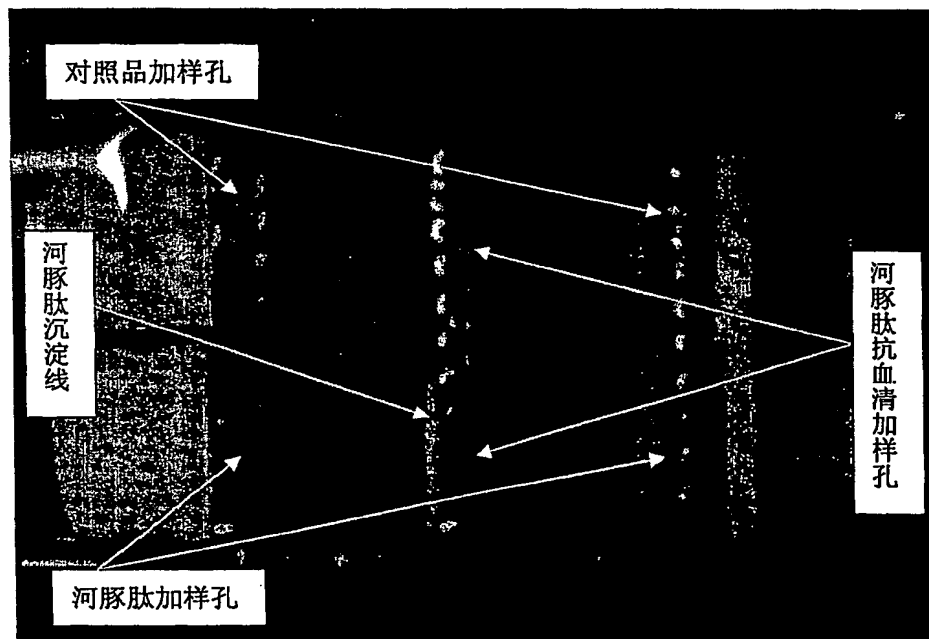


图 2.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.